



**Ana Rita Alcântara
Gonçalves**

**Sequenciação do gene *DMD*: uma mais-valia no
diagnóstico das distrofinopatias**



**Ana Rita Alcântara
Gonçalves**

**Sequenciação do gene *DMD*: uma mais-valia no
diagnóstico das distrofinopatias**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Sónia Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e da Dr^a Rosário Santos, Assessora Principal de Genética do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, INSA.

Dedico este trabalho à minha avó Olga

o júri

presidente

Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Elsa Maria Ribeiro Bronze da Rocha
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Maria do Rosário Neto dos Santos
Assessora Principal de Genética do Centro de Genética Médica Dr. Jacinto Magalhães, INSA

Sonia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me ajudaram e apoiaram na realização deste trabalho.

À Dra Rosário, por me ter possibilitado a realização deste trabalho e pela orientação prestada, expresso o meu agradecimento.

Ao Jorge Oliveira gostaria de agradecer toda a disponibilidade, o espírito crítico e sugestões.

Aos meus colegas de mestrado, cuja presença foi um estímulo fundamental para a realização desta etapa.

A todos os meus colegas da Unidade de Genética Molecular que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de longa data e aos meus amigos mais recentes, mas muito especiais e insubstituíveis, agradeço todo o apoio, amizade, cumplicidade e sacrifícios. Desculpem a minha ausência nos últimos tempos.

Aos meus pais, por todo o carinho e apoio incondicional desde sempre.

palavras-chave

DMD, mutações pontuais, distrofina, distrofinopatias, Distrofia muscular de Duchenne/Becker, sequenciação

resumo

A distrofia muscular mais comum é a Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD), globalmente designada de distrofinopatia. A DMD é caracterizada por fraqueza muscular detectada aos 3-5 anos, perda de marcha aos 10-12 anos e morte na segunda década de vida por insuficiência respiratória e cardíaca. Contrastando, a BMD, uma forma alélica e menos grave da doença,, com um aparecimento dos sintomas mais tardio e uma progressão mais lenta. Esta patologia é causada por mutações no gene *DMD*, que codifica a proteína Distrofina.

As mutações mais frequentes do gene *DMD* são as deleções e duplicações de um ou vários exões, correspondendo a 2/3 dos casos, e as restantes mutações pontuais. O diagnóstico molecular de rotina desta patologia utiliza como técnicas o *Southern Blot*, o PCR multiplex e o *multiplex ligation-probe amplification* (MLPA), que permitem a detecção das deleções e duplicações nos indivíduos afectados e ainda a definição do estatuto de portadoras nos elementos das suas famílias.

O objectivo deste estudo é implementar uma metodologia para pesquisa de mutações pontuais por sequenciação directa genómica do gene *DMD*, cobrindo as 79 regiões codificantes e as junções intrónicas flaqueadoras. Esta técnica é combinada com a análise do mRNA por RT-PCR obtido a partir de biópsia muscular.

A amostra seleccionada para este estudo consistiu em 25 pacientes com diagnóstico clínico de distrofinopatia e com diagnóstico molecular negativo para deleções e duplicações. Foram detectadas 22 mutações (88% dos pacientes), incluindo 6 mutações *nonsense*, 9 mutações de alteração da grelha de leitura (*frameshift*), 6 mutações de *splicing* e uma deleção de um codão. Destas alterações, 11 não se encontravam previamente descritas na literatura ou na base de dados específica do locus *DMD*.

Esta abordagem vai permitir uma caracterização molecular precisa e diferencial dos pacientes, permitindo a sua inclusão como possíveis candidatos às terapias genicas actualmente em investigação. Para além disso, e de uma forma mais imediata, permite fornecer um aconselhamento genético e um diagnóstico pré-natal mais preciso às suas famílias.

keywords

DMD, point mutations, dystrophin, dystrophinopathies, Duchenne/Becker muscular dystrophy, sequencing

abstract

The most common muscular dystrophy is the Duchenne and Becker Muscular Dystrophy (DMD/BMD), named also as dystrophinopathies. DMD is characterized by progressive muscular wasting the age of 3-5, wheelchair bondage at the age of 10-12 and death in their twenties as a result of respiratory and cardiac insufficiency. By contrast, BMD is a milder allelic form with a later onset and slower progression. This disease is caused by mutations in the *DMD* gene that encodes for Dystrophin.

Deletions and duplications of one or more exons are the most frequent *DMD* gene defects associated with the disease (about 2/3 DMD/B patients), with more subtle mutations account for the remaining cases. The standard diagnostic approach using Southern blotting, multiplex PCR and multiplex ligation-probe amplification (MLPA), enables the detection of deletions and duplications, as well the ascertainment of carrier status in their families.

The goal of this study is to implement a point mutation screening methodology by direct genomic sequencing of the *DMD* gene, covering all 79 coding regions and flanking intronic junctions. This technique is combined with mRNA analysis by RT-PCR of samples obtained from muscle biopsies.

The sample selected for this analysis consisted of 25 patients with compatible clinical features and previously found to be negative for either deletions or duplications. We were able to identify 22 point mutations (88% of patients) that included 6 nonsense, 9 frameshift, 6 splicing mutations and 1 codon deletion. Of these, 11 have not been reported in the literature or in the *DMD* locus specific database.

This approach will lead to a differential and precise molecular characterization of the patients, enabling them to be included as candidates for the gene therapies that are currently running. An immediate benefit from this work relates to accurate genetic counselling and prenatal diagnosis to patients families.

INDICE

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. As distrofias musculares	3
1.2. O Complexo Distroglicano	4
1.3. A proteína Distrofina	5
1.4. A Distrofia Muscular de Duchenne / Becker	7
1.4.1. Caracterização Clínica	7
1.4.2. Análise electromiográfica (EMG)	9
1.4.3. Concentração de creatina-cinase no soro	9
1.4.4. Estudo histológico e imunohistoquímico	9
1.4.5. Diagnóstico Molecular	11
1.5. O gene <i>DMD</i>	11
1.5.1. Espectro mutacional do gene <i>DMD</i>	13
1.6. Envolvimento do sistema nervoso central na DMD/BMD	14
1.7. Envolvimento da retina	15
1.8. Cardiomiopatia dilatada ligada ao X	15
1.9. Técnicas de diagnóstico molecular da DMD/BMD	16
1.10. Correlação genótipo/ fenótipo	18
1.10.1. Delecções e duplicações	18
1.10.2. Mutações pontuais	19
1.11. Aconselhamento genético	20
1.12. Gestão e tratamento da doença	21
1.13. Novas oportunidades de tratamento	21
1.14. Objectivos	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. Amostra seleccionada	29
2.2. Material biológico	31
2.3. Extracção de DNA	31
2.4. Extracção de RNA	31
2.5. Estudo de haplotipagem	31
2.6. Estudo do gene <i>DMD</i>	33
2.6.1. Amplificação do gDNA	34
2.6.2. Purificação dos produtos PCR	34
2.6.3. Reacção de sequenciação	34
2.6.4. Purificação dos produtos de sequenciação	35
2.6.5. Electroforese capilar	35
2.7. Análise da expressão do gene <i>DMD</i> a nível do mRNA	35
2.8. Rastreio populacional	36
2.9. Análise Bioinformática	37
2.10. Nomenclatura das mutações e base de dados	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1. Mutações que envolvem o <i>splicing</i>	42
3.1.1. Mutações de <i>splicing</i> que envolve o reconhecimento de um novo local crítico exónico de <i>splicing</i>	42
3.1.2. Mutações de <i>splicing</i> que provocam o <i>skipping</i> de um ou vários exões	44
3.1.3. Mutações de <i>splicing</i> que envolvem retenção intrónica parcial	50
3.2. Mutações nonsense:	51

3.3. Mutações de alteração da grelha de leitura (<i>frameshift</i>) - pequenas deleções ou pequenas inserções	53
3.3.1. Mutações <i>frameshift</i> não descritas na literatura	53
3.3.2. Mutações <i>frameshift</i> descritas na literatura	58
3.4. Deleção de codão	59
3.5. Casos negativos	63
3.6. Correlação fenótipo/genótipo	64
3.7. Implicações do processo de <i>splicing</i>	66
4. CONCLUSÃO	71
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	73
6. BIBLIOGRAFIA	77
7. ANEXOS	105
7.1 - Procedimentos complementares	105
7.2 - Sequência de primers e preparação das misturas de marcadores	107
7.3 - Soluções	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Imagem representativa do complexo distroglicano (DGC)	4
Figura 1.2 – Representação de alguns sinais clínicos de DMD	7
Figura 1.3 – Locais de reconhecimento dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica da distrofina	10
Figura 1.4 – Representação dos domínios e promotores da distrofina	14
Figura 1.5 – Representação gráfica da relação entre a localização das deleções <i>in-frame</i> e o fenótipo	19
Figura 3.1 – Esquema exemplificativo das alterações encontradas, relativamente à posição no gene e domínios da proteína distrofina.	40
Figura 3.2 – Mutação c.9287-1G>A (caso 328).	42
Figura 3.3 – Representação parcial da sequenciação do cDNA de uma amostra controlo e do caso 328.	43
Figura 3.4 – Análise por RT-PCR dos transcritos presentes no músculo do caso 346 em gel agarose 2%/TAE (m/v)	44
Figura 3.5 – Esquema representativo dos transcritos detectados no caso 346	44
Figura 3.6 – Árvore da família 346 e respectiva haplotipagem	45
Figura 3.7 – Mutação c.9564-1G>A (caso 404).	45
Figura 3.8 – Análise por RT-PCR do transcrito presente no músculo do caso 404, em gel agarose 2%/TAE(m/v).	46
Figura 3.9 – Representação parcial da sequência do cDNA de uma amostra controlo e do caso 404.	46
Figura 3.10 – Mutação c.9361+1G>A (caso 341).	47
Figura 3.11 – Representação parcial da sequência do cDNA do caso 341.	47
Figura 3.12 – Mutação c.10223+1G>A (caso 368).	49
Figura 3.13 – Análise por RT-PCR dos transcritos presentes no músculo do caso 413, em gel agarose 2%/TAE(m/v).	50
Figura 3.14 – Esquema representativo da retenção intrónica parcial no caso 413.	50
Figura 3.15 – A) Árvore da família do caso 24 e respectiva haplotipagem. B- Mutação c.5328_5332delinsTCCTTTGAAGGC (caso 24).	53
Figura 3.16 – A) Árvore da família 003 e respectiva haplotipagem B) Mutação c.8098_8099delAA (caso 003)	54
Figura 3.17 – Mutação c.1529_1530delTC (caso 231).	54
Figura 3.18 – Árvore e análise haplotípica a elementos da família do caso 274	55
Figura 3.19 – Mutação c.8233delA (caso 274).	55
Figura 3.20 – Mutação c.8098_8099delAA (caso 301).	56
Figura 3.21 – Mutação c.10656delT (caso 371).	56

Figura 3.22 – Mutação c.7179_7180delAC (caso 379).	57
Figura 3.23 – Mutação c.10097_10099delGAG (caso 311).	58
Figura 3.24 – Representação parcial do alinhamento da distrofina humana com distrofinas de outras espécies, evidenciando a conservação do aminoácido 3366.	59
Figura 3.25 – Mutação c.10097_10099del (caso 311).	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Principais isoformas da distrofina.	13
Tabela 2.1 – Resumo das características clínicas, imunohistoquímicas e laboratoriais dos doentes estudados	29
Tabela 2.2 – Descrição dos macadores utilizados na análise de haplotipagem	31
Tabela 2.3 – Descrição dos primers desenhados para o estudo do gene DMD	32
Tabela 2.4 – Descrição dos primers utilizados no rastreio populacional	36
Tabela 3.1 – Descrição das mutações que envolvem o <i>splicing</i> e dos seus diferentes efeitos a nível do mRNA	41
Tabela 3.2 – Descrição das mutações <i>nonsense</i> encontradas	51
Tabela 3.3 – Descrição das mutações de <i>frameshift</i> (pequenas deleções e pequenas inserções)	52

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMD	Distrofia Muscular de Becker
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
CK	Enzima creatina-cinase (<i>Creatine-kinase</i>)
CpG	Regiões do DNA onde uma guanina é precedida de uma citosina.
C-terminal	Carboxilo-terminal
ddNTPs	2,3 - dideoxiribonucleótidos
DGC	Complexo distroglicano (<i>dystrophin-glicoprotein complex</i>)
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
Dhplc	<i>Denaturing high performance liquid chromatography</i>
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxiribonucleótido trifosfato
DOVAM-S	<i>Detection of virtually all mutations - SSCP</i>
DYS1,2,3	anticorpos da distrofina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMG	Electromiografia
ESE	<i>Exonic sequence enhancer</i>
ESS	<i>Exonic sequence silencer</i>
Gbr2	<i>Growth factor receptor-bound protein2</i>
ISE	Intronic sequence enhancer
ISS	Intronic sequence silencer
KDa	kilo Dalton
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
NOS	Síntase de óxido nítrico
N-terminal	Amino-terminal
pb	pares de bases
PCR	Reacção da polimerase em cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PTT	<i>Protein Truncation Test</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverse-Transcriptase PCR
SG	Sarcoglicano
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
UCDS	<i>Universal condition direct sequencing</i>
XLDC	Cardiomiopatia dilatada ligada ao X (<i>X-linked Dilated Cardiomyopathy</i>)

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. As distrofias musculares

As distrofias musculares são um grupo de doenças genéticas muito heterogêneas que, de uma forma geral, são caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível dos músculos esquelético e/ou cardíaco.

Numa distrofia, do ponto de vista histológico, as fibras musculares são frágeis e consequentemente sofrem ruptura do sarcolema e, logo, necrose. Apesar das fibras necróticas possuírem capacidade de regeneração, os ciclos sucessivos de degeneração e regeneração vão induzir a presença de fibrose entre elas e o músculo é gradualmente substituído por tecido fibroso e adiposo. Os músculos distróficos apresentam igualmente variação a nível do tamanho das fibras musculares e alterações miopáticas, nomeadamente núcleos centrais e divisão da fibra através de uma fenda longitudinal (*splitting*), que ocorre principalmente em fibras hipertróficas (Dubowitz, 2006).

Do ponto de vista bioquímico, os doentes com distrofia muscular apresentam concentrações elevadas de creatina-cinase (CK) no soro.

A classificação das diferentes distrofias musculares baseia-se em parâmetros como o modo de hereditariedade, a idade de aparecimento dos sintomas, o padrão de músculos afectados e a progressão da doença (Watson & Nattrass, 1954).

A forma mais comum de distrofia muscular é uma distrofia muscular recessiva ligada ao X, a distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD), globalmente designadas por distrofinopatias.

A identificação da distrofina e a subsequente caracterização do complexo distroglicano (DGC) associado aos seus componentes integrais e periféricos, revelou-se um passo essencial para a clarificação da patogénese molecular das distrofias musculares (Campbell *et al.*, 1989; Ervasti *et al.*, 1990).

1.2. O Complexo Distroglicano

O Complexo Distroglicano (DGC) (Campbell *et al.*, 1989; Ervasti *et al.*, 1991) é formado por proteínas periféricas e integrais, que formam uma ligação entre a F-actina do citoesqueleto e a laminina-2, localizada na matriz extracelular (Yoshida *et al.*, 1990). Estruturalmente, estas proteínas estão organizadas em 3 subcomplexos distintos, tendo em conta a sua localização (Figura 1.1): 1) as proteínas distrofina, sintrofinas e distrobrevina, localizadas no citoesqueleto; 2) o β -distroglicano, os sarcoglicanos (α , β , γ e δ) e o *sarcospan*, localizados no sarcolema; 3) o α -distroglicano e a laminina- $\alpha 2$, localizados na matriz extracelular.

Os vários tipos de distrofias musculares surgem de mutações em genes que codificam componentes deste complexo (Campbell, 1995). Também as interações entre os subcomplexos são muito importantes para a ligação ao sarcolema e para a estabilização da membrana (Cohn *et al.*, 2000).

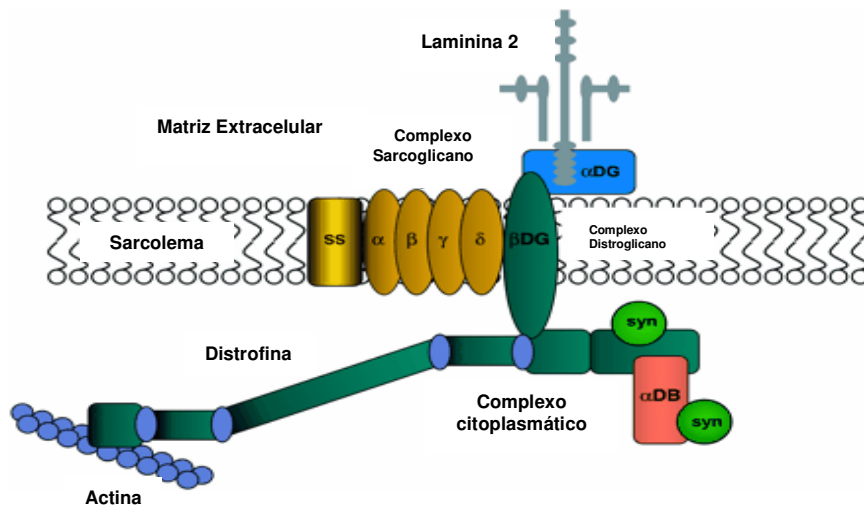


Figura 1.1 – Imagem representativa do complexo distroglicano (DGC); SS – *sarcospan*; β -DG – β -distroglicano; syn – sintrofina; α -DB – distrobrevina. Adaptado de *Physiol Rev* 2002; **82**(2):291-329.

Este complexo está presente no sarcolema do músculo esquelético e cardíaco, e é indispensável à manutenção da integridade da fibra muscular durante a contracção ao atenuar e redistribuir o stress resultante da actividade contráctil (Ervasti *et al.*, 1991; Petrof *et al.*, 1993).

O facto de mutações nos restantes componentes do DGC originarem várias formas de distrofias musculares, enfatiza o facto deste complexo assumir não só um papel mecânico e estrutural, mas também funções específicas relacionadas com os mecanismos de vias de sobrevivência e defesa celular, regulados por cascatas de sinalização (Rando, 2001b). A sua localização no sarcolema contribui para a hipótese de que o DGC funciona como plataforma de sinalização transmembranária, em resposta a factores de stress extracelulares. Exemplos comprovados de moléculas sinalizadoras que interagem com estes componentes são a camodulina, a sintase de óxido nítrico (NOS) e a Gbr2 (Petrof *et al.*, 1993; Brenman *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995; Rando, 2001a).

1.3. A proteína Distrofina

A distrofina é uma grande proteína alongada com um peso molecular de 427kDa e constituída por 4 domínios, como se pode observar na Figura 1.4 (Hoffman *et al.*, 1987; Koenig *et al.*, 1988).

A) O domínio **Amino-terminal** (N-Terminal), que se liga à actina, e que contém entre 232 a 240 aminoácidos, dependendo da isoforma (Aman *et al.*, 1998). No domínio N-terminal estão presentes 3 locais de ligação à actina (Koenig *et al.*, 1990, Rybakova *et al.*, 1996).

B) O domínio **Central-Rod**, que é uma sucessão de 24 unidades repetitivas, semelhantes as repetições em hélices triplas da espectrina, que são intersectadas por 4 regiões *hinge* ricas em prolina, e que contém 3000 resíduos. Estas unidades repetitivas representam a maioria da proteína e têm um papel fundamental na estrutura *rodlike* flexível que apresenta. Inclui o 4º local de ligação à actina, localizado entre as unidades repetitivas 11-17 (Koenig *et al.*, 1990, Rybakova *et al.*, 1996 e 2006).

C) O domínio **Rico em cisteína** (ou Cisteínico), que contém vários motivos identificados mais recentemente: um domínio WW (Huang, 2000), com dois aminoácidos triptofano altamente conservados seguido de séries de *EF-Hand* que, conjuntamente, medeiam a ligação da distrofina ao β -dystroglicano, e um domínio ZZ (Ponting *et al.*, 1996) que se pensa ter um papel na ligação ao Zn^{2+} e na mediação de interacções proteína-proteína. As *EF-Hand*, semelhantes à α -actina, pensa-se ainda que permite a ligação do Ca^{2+} intracelular (Koenig *et al.*, 1988).

D) O domínio **carboxilo-terminal** (C-terminal), que se liga às sintrofinas e α -dystrobrevinas (Campbell *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1990).

O β -dystroglicano, por sua vez, está ligado via o α -dystroglicano à laminina-2, proteína da matriz extracelular (Ervasti *et al.*, 1991).

A dystrofina constitui, desta forma, uma ponte mecânica ao longo do sarcolema que, de forma flexível, estabelece uma ligação entre a camada basal da matriz extracelular e o citoesqueleto interior, e interage com a rede sarcomérica por ligação à F-actina (Ervasti *et al.*, 1991; Rybakova *et al.*, 1996; Rando, 2001).

A ausência da dystrofina do subsarcolema dos pacientes com DMD perturba a composição estrutural do DGC, reduzindo a presença de todos os seus componentes proteicos. Este facto causa instabilidade do sarcolema que, com os ciclos repetidos de contracção e relaxamento muscular, acaba por causar ruptura da membrana e provocar degeneração e necrose das fibras musculares.

Os mecanismos patofisiológicos que originam morte celular ainda não estão bem esclarecidos, no entanto, sabe-se que a perturbação do DGC torna as fibras musculares mais permeáveis, aumentando a concentração de Ca^{2+} intracelular. Esta alteração na homeostase do Ca^{2+} poderá estar relacionada com uma desregulação do metabolismo mitocondrial e a activação de proteases dependentes do cálcio e, em última instância, promover a morte celular (Constantin *et al.*, 2006). Paralelamente, verifica-se uma alteração no metabolismo dos radicais livres, tornando as fibras musculares susceptíveis a stress oxidativo (Disatnik *et al.*, 2000; Rando, 2001).

A síntese da proteína dystrofina é codificada pelo gene *DMD* (Duchene Muscular Dystrophy).

1.4. A Distrofia Muscular de Duchenne / Becker

1.4.1. Caracterização Clínica

A patologia DMD (Distrofia Muscular de Duchenne) tem uma incidência bastante elevada, afectando 1 em cada 3500 recém nascidos do sexo masculino (Emery, 1993).

Geralmente, a DMD tem uma apresentação precoce com atraso motor generalizado como problemas na marcha, caminhar em bico de pés, atraso no desenvolvimento de marcha autónoma e, mais raramente, dificuldades de aprendizagem e problemas de linguagem (Bresolin *et al.*, 1994). A idade média de diagnóstico em rapazes que não apresentam história familiar ronda os 3-5 anos (Emery, 1993).

Os doentes apresentam uma fraqueza muscular proximal que, clinicamente, se vai traduzir numa marcha instável, na dificuldade em subir escadas e em correr, em hiperlordose lombar, e na utilização da manobra de Gowers para se levantarem, onde utilizam os braços como suplemento da pouca força a nível dos músculos pélvicos da cintura. Também a nível dos gêmeos observa-se hipertrofia e, ocasionalmente, dor muscular (Figura 1.2).



Figura 1.2 – Representação de alguns sinais clínicos de DMD.

A) Hipertrofia dos gêmeos e hiperlordose; B) Representação da manobra de Gowers.

A progressão da doença é extremamente rápida: as crianças afectadas perdem a marcha autónoma e ficam confinadas a uma cadeira de rodas por volta dos 10-12 anos. A incidência de cardiomiopatia aumenta significativamente ao longo da adolescência (afectando todos os doentes até aos 18 anos) e muito raramente sobrevivem além segunda

década de vida, por complicações respiratórias (devido a fraqueza muscular intercostal e infecções respiratórias) e problemas cardíacos (Emery, 1993).

Contrastando, a BMD (Distrofia Muscular de Becker) é menos grave e muito mais heterogénea no seu fenótipo clínico. É caracterizada por um aparecimento mais tardio de uma fraqueza a nível dos músculos esqueléticos, com os doentes a manterem a marcha autónoma durante a década de 20. Apesar do envolvimento músculo-esquelético ser menos severo que na DMD, a cardiomiopatia dilatada é a causa mais comum de morbilidade e de mortalidade, que ocorre por volta dos 40 anos. Para além disso, enquanto o padrão de envolvimento muscular é muitas vezes similar, a idade de aparecimentos dos sintomas e progressão da doença é muito mais variável. O vasto espectro fenotípico pode incluir pacientes com início de apresentação de sintomas após os 30 anos e que permanecem com marcha autónoma até à década de 60 (Emery, 1993). Os doentes BMD podem ainda apresentar como sintomas a presença de CK elevados, hipertrofia dos gêmeos, caímbra musculares, mialgia, e/ou cardiomiopatia na ausência de fraqueza significativa (Gospe *et al.*, 1989, England *et al.*, 1990).

A BMD também apresenta uma incidência menor que a DMD, afectando 1 em 12000 (Emery, 2002).

Há ainda registo de atraso mental associado a um terço dos pacientes BMD e DMD, como é desenvolvido no ponto 1.5 (Bresolin *et al.*, 1994).

As portadoras de DMD geralmente apresentam CK elevados e alterações electrocardiográficas e cerca de 5-10% apresentam algum grau de manifestação clínica, nomeadamente alguma fraqueza muscular e hipertrofia dos gêmeos. Esta fraqueza associada a portadoras é geralmente assimétrica, pode desenvolver-se durante a infância, ser apenas evidente na idade adulta, ou pode desenvolver-se lentamente de forma progressiva seguida de uma estabilização (Emery, 2002).

Ocasionalmente, indivíduos do sexo feminino podem apresentar ainda características clínicas típicas de DMD. Este facto surge como resultado da ocorrência de re-arranjos no cromossoma X envolvendo o locus do gene DMD, pela presença de um síndrome de Turner (ausência completa ou parcial do cromossoma X) ou por um desvio de inactivação do cromossoma X.

1.4.2. Análise electromiográfica (EMG)

Esta técnica permite estudar a actividade eléctrica que se cria durante a contracção das fibras musculares e assim avaliar a estrutura e funcionamento das unidades motoras, ou seja, avaliar a actividade de um grupo de fibras musculares que são activadas por um único neurónio, produzindo potenciais de acção únicos (Emery, 1993).

Este método é essencialmente importante quando se trata de estabelecer a natureza miopática da distrofia e excluir outras causas neurogénicas de fraqueza, como doenças do sistema nervoso periférico (Emery, 2002).

1.4.3. Concentração de creatina-cinase no soro

A determinação da concentração da creatina-cinase (CK) no soro é um parâmetro de avaliação bastante simples, que se encontra elevado em algumas doenças distróficas. Este facto surge como consequência da ruptura da membrana plasmática que causa libertação das enzimas musculares na corrente sanguínea. Este parâmetro de diagnóstico é igualmente importante na identificação de portadoras na ausência de estudo molecular conclusivo, na medida em que estas geralmente apresentam valores de CK elevados.

1.4.4. Estudo histológico e imunohistoquímico

As alterações histológicas clássicas em DMD e BMD incluem o arredondamento e variação difusa do tamanho das fibras, hipertrofia e atrofia das fibras, necrose e subsequente perda de fibras, fibras basófilas regenerativas, fibras hiper-contraídas com marcação intensa, aumento dos núcleos internos, proliferação de tecido conjuntivo perimisial e endomisial, aumento de tecido adiposo e, por vezes, aumento da resposta celular (com presença de macrófagos, células T e mioblastos). Estas características, colectivamente, são referidas como distróficas e reflectem a perda progressiva de músculo e a natureza necrótica do tecido (Dubowitz, 2006).

Os anticorpos comerciais normalmente utilizados na imunohistoquímica do diagnóstico da DMD e BMD reconhecem epítomos em 3 dos 4 domínios da distrofina, como se observa na Figura 1.3.

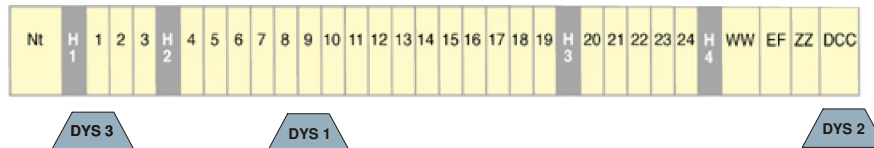


Figura 1.3 – Locais de reconhecimento dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica da distrofina. O anticorpo DYS1 reconhece os aminoácidos 1181 a 1388 (no domínio *Central Rod* da proteína), o DYS2 reconhece os aminoácidos 3668 a 3684 (no domínio C-Terminal), e o anticorpo DYS3 tem como epítopo os aminoácidos 321-494 (na região proximal do domínio *Central Rod* da proteína).

Na maioria dos casos DMD, a distrofina não é detectável nas fibras musculares. Em contrapartida, na BMD as fibras apresentam marcação irregular no sarcolema, uma redução geral de todas as fibras (com ou sem fibras ocasionais com marcação intensa) ou então pequenas diferenças detectáveis, quando comparadas com um testemunho normal (Dubowitz, 2006).

É, no entanto, possível detectar baixos níveis de expressão da distrofina em alguns casos DMD, provavelmente de transcritos *minor* do gene, ou pelo facto da distrofina ser predominante em fibras conhecidas como fibras revertidas. A expressão destas fibras revertidas é de intensidade normal e surge do restauro da grelha de leitura, sugerindo eventos de *splicing* no gene (Lu *et al.*, 2000).

Na interpretação destes resultados é necessário ter em conta que a expressão anormal da distrofina na DMD e BMD está associada com uma expressão secundária anormal em outras proteínas do DGC: essencialmente, ocorre uma redução secundária dos sarcoglicanos na DMD e BMD e, por sua vez, quando o β -sarcoglicano está defeituoso, pode ocorrer uma redução secundária da marcação da distrofina. Por este motivo, é importante examinar os sarcoglicanos em conjugação com a distrofina (Dubowitz, 2006).

1.4.5. Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular reside no estudo do gene que codifica a distrofina, o gene *DMD*. É um passo fundamental pois permite confirmar o diagnóstico, obter um diagnóstico diferencial, fornecer um prognóstico da doença, aconselhamento genético, diagnóstico pré-natal, e fornecer indicação para as novas abordagens terapêuticas.

Neste estudo, descreve-se o gene *DMD*, o seu espectro mutacional, as técnicas envolvidas no diagnóstico molecular da DMD e BMD e de que forma as mutações neste gene se vão reflectir no fenótipo das distrofinopatias.

1.5. O gene *DMD*

A identificação do gene *DMD* no cromossoma X foi o primeiro triunfo a nível de clonagem posicional, permitindo-o localizar no Xp21 (Koenig *et al.*, 1987).

O gene *DMD* é maior gene descrito nos humanos, englobando aproximadamente 2,5 Mb de sequência genómica, o que corresponde a cerca de 0,1% do total do genoma humano, e a 1.5% de todo o cromossoma X. É composto por 79 exões e 99% do gene é composto por sequências intrónicas (Ahn *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1993).

A forma mais longa de mRNA, 14kb, é predominantemente expressa no músculo esquelético e cardíaco e, em baixa proporção, no cérebro (Koenig *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1987; Bies *et al.* 1992a e 1992b).

A expressão dos transcritos mais longos (*full-length*) é controlada por 3 promotores regulados independentemente: os promotores do Cérebro (B), Músculo (M) e das células Purkinje (P) que consistem num primeiro exão único, com 78 exões comuns (Feener *et al.*, 1989, Byers *et al.*, 1991; Gorecki *et al.*, 1992; Bies *et al.* 1992a e 1992b; Ahn *et al.*, 1993; Muntoni *et al.*, 2003).

Para além destes, o gene *DMD* tem também pelo menos 4 promotores internos que originam transcritos mais pequenos da distrofina, mas que mantêm o domínio Rico em cisteína e o domínio C-Terminal, e que são referidos como Retina (R), Cérebro-3 (B3),

Células Schwann (S) e Geral (G). Cada um destes promotores usam um primeiro exão único que realiza *splicing* nos exões 30, 45, 56 e 63 (Muntoni *et al.*, 2003).

Na tabela 1.1 pode encontrar-se, de uma forma resumida, as principais isoformas da distrofina, os respectivos promotores, tamanho e os tecidos onde são predominantemente expressos.

Tabela 1.1 -Principais isoformas da distrofina

<i>Símbolo</i>	<i>Isoforma</i>	<i>Localização do promotor</i>	<i>Tamanho da proteína</i>	<i>Padrão de expressão da proteína</i>
Dp427 (B)	Cérebro (cortical)	A 5' do promotor do músculo	427 kDa	Neurónios corticais; músculo esquelético e cardíaco
Dp427 (M)	Músculo	Entre o promotor do cérebro e o intrão 1	427 kDa	Músculo esquelético e cardíaco; células da glia
Dp427 (P)	Células Purkinje	Entre intrão 1 e intrão 2	427 kDa	Células Purkinje do cerebelo (também músculo esquelético)
Dp260 (R)	Retina	Intrão 29	260 kDa	Retina; (também cérebro e coração)
Dp140 (B3)	Cérebro-3	Intrão 44	140 kDa	Sistema nervoso central; rim
Dp116 (S)	S-Distrofina	Intrão 55	116 kDa	Células Schwann
Dp71 (G)	G-Distrofina	Intrão 62	71 kDa	Cérebro, fígado, músculo cardíaco (ubiquitário, excepto músculo esquelético)

Para além destas, a existência de diversos *splicings* alternativos detectados tanto na extremidade 5' como na extremidade 3' do gene (correspondente ao domínio C-Terminal da distrofina) permite a presença de ainda mais isoformas (Feener *et al.*, 1989; Bies *et al.*, 1992b; Surono *et al.*, 1997 e 1999).

A figura seguinte resume, esquematicamente, os principais transcritos da distrofina e os domínios que a caracterizam.

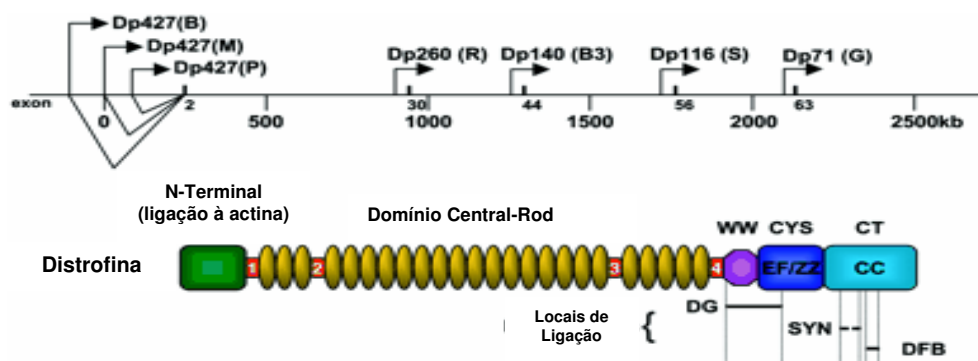


Figura 1.4 – Representação dos domínios e promotores da distrofina. A distrodina apresenta um domínio N-Terminal de ligação à actina, um domínio *Rod-Central*, um domínio Rico em cisteína (CYS), que inclui os motivos WW, EF e ZZ, e um domínio C-Terminal (CT). As setas indicam os vários promotores: Dp427 (B), Dp427 (M), Dp427 (P), Dp260(R), Dp140(B3), Dp116(S) e Dp71(G). Adaptado de *Physiol. Rev* 2002; **82**: 291-329.

1.5.1. Espectro mutacional do gene *DMD*

O facto do gene *DMD* ser genomicamente muito grande, origina uma taxa de mutações igualmente enorme, especialmente quando comparado com a taxa mutacional média estimada para humanos (1.10^{-4} vs 10^{-5} a 10^{-6} para genes humanos) (Nachman, 2004). Actualmente, na base de dados do locus *DMD*, estão descritas mais de 4700 mutações diferentes (Aartsma-Rus *et al.*, 2006), sendo que um terço destas são mutações *de novo* (Emery, 1993).

As mutações mais comuns são as deleções intragénicas de um ou mais exões e que representam cerca de 65% das todas as mutações descritas, e que se encontram predominantemente distribuídas por dois *hot-spots*, localizados nos exões 2 a 19 e, principalmente, nos exões 45 a 53 (Koenig *et al.*, 1987 e 1989; Beggs *et al.*, 1990a, Kunkel *et al.*, 1986). Por sua vez, as duplicações singulares ou multiexónicas compreendem cerca de 7% dos pacientes e têm como *hotspot* os exões 2 a 20 (Hu *et al.*, 1990; White *et al.*, 2002 e 2006).

Existem ainda 20-30% de mutações que são alterações pontuais e que, regra geral, afectam a grelha de leitura (*frameshift*) ou resultam em codões *nonsense*. Uma parte significativa destas mutações afectam também o *splicing* do RNA, seja por perda dos locais consenso de

splicing ou pela activação de locais crípticos de *splicing*. Apenas 5 mutações *missense* são apresentadas na base de dados do locus *DMD*, todas descritas previamente (Prior *et al.*, 1995; Lenk *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 1998; Hamed *et al.*, 2006; Derbugrave *et al.*, 2007). Estas mutações *missense* encontram-se localizadas ou no domínio Cisteínico (de ligação ao β -dístroglicano) causando DMD, ou no domínio N-Terminal, onde se prevê que altere a estrutura tridimensional do domínio de ligação à actina, e as quais se encontram descritas em dois pacientes com BMD.

Relativamente à origem das mutações, estudos de Grimm (1994) e Tuffery-Giraud (2004) e seus colaboradores, sugerem que a grande maioria das deleções têm origem na oogénese enquanto que as mutações pontuais têm essencialmente origem no cromossoma X do avô materno durante a espermatogénese, prevendo-se que a maioria das mães sejam portadoras, o que torna o diagnóstico molecular particularmente importante.

1.6. Envolvimento do sistema nervoso central na DMD/BMD

Para além dos músculos esquelético e cardíaco, o cérebro é o local que apresenta uma maior expressão da distrofina. Expressa duas isoformas *full-length* e ainda dois transcritos alternativos: o Dp140, iniciado no exão 45, e o Dp71, iniciado no exão 63 (Figura 1.4).

Uma parte significativa dos doentes DMD e BMD manifestam vários níveis de atraso no desenvolvimento cognitivo, especialmente a nível da linguagem verbal (Bresolin *et al.*, 1994).

As evidências que mutações na região mais distal do gene estão mais frequentemente associadas a atraso mental, parece residir no facto destas mutações afectarem a expressão não só das isoformas *full-length*, mas também das duas isoformas mais pequenas (Dp140 e Dp71).

Bardoni *et al.* (1999) mencionam uma correlação estatisticamente significativa entre a ausência do promotor Dp140 e a apresentação fenotípica de atraso mental em pacientes com BMD. Lenk *et al.* (1993), Tuffery *et al.*, (1995) e Moizard *et al.*, (2000) descrevem várias mutações (deleções exónicas e mutações pontuais) em pacientes com atraso mental

grave em zonas correspondentes à região codificante do Dp71 (a 3' do exão 63), em que é provável estarem associadas com a perda de todas as isoformas de distrofina produzidas pelo cérebro.

1.7. Envolvimento da retina

Os doentes afectados com DMD têm uma acuidade visual normal podendo evidenciar, no entanto, defeitos significativos aquando submetidos a uma electroretinografia (Pillers, 1993 e 1999; Sigesmund, 1994). Apenas mutações localizadas na região central e da extremidade 5' do gene afectam a isoforma Dp260 (retina) resultando em ondas electroretinográficas anormais (Sigesmund, 1994; Pillers, 1999).

1.8. Cardiomiopatia dilatada ligada ao X

A cardiomiopatia dilatada ligada ao X (XLDC) faz parte de um grupo geneticamente heterogéneo de cardiomiopatias dilatadas, onde se comprovou ser uma patologia alélica à BMD e DMD (Towbin, 1993). No entanto, e contrastando com a BMD e DMD, nestes pacientes a única sintomatologia está relacionada com um fenótipo cardíaco, apesar se uma análise mais minuciosa permitir verificar uma correlação do musculo esquelético, já que estes doentes normalmente apresentam CKs aumentados e alterações miopáticas em biópsia muscular (Muntoni, 1993).

Existem duas regiões do gene *DMD* que estão frequentemente envolvidas na XLDC: a extremidade 5' e a região *Central-Rod*, especialmente os exões 48 e 49 (Ferlini *et al.*, 1995).

1.9. Técnicas de diagnóstico molecular da DMD/BMD

A existência de *hotspots* de exões delectados levou ao desenvolvimento do PCR Multiplex, na qual são amplificados os 18 exões mais frequentemente abrangidos nas alterações descritas (Chamberlain *et al.*, 1988; Beggs *et al.*, 1990c). Também a técnica de *Southern Blot* tem sido bastante utilizada como rotina para a detecção de deleções e por vezes, de duplicações, onde a utilização de sondas que abrangem a totalidade das regiões codificantes permite uma melhor definição da região mutada. No entanto, é uma técnica morosa, bastante trabalhosa e pouco clara na detecção de duplicações devido às dificuldades de interpretação em algumas regiões do gene.

Qualquer uma destas técnicas, no entanto, não permite a identificação sistemática de todas as deleções e duplicações, não define com precisão as suas fronteiras exónicas, e não permite a determinação genotípica das portadoras da mutação.

Mais recentemente, surgiram técnicas como o MLPA (*Multiplex Ligation-Probe Amplification*), que permitiu colmatar as dificuldades de detecção mutacional já referidas, pois quantifica o número de cópias presentes de um determinado exão, utilizando sondas específicas para cada um dos 79 exões do gene (White *et al.*, 2002 e 2006). É uma técnica simples, rápida e que abrange um largo espectro mutacional, pelo que é usualmente introduzida na rotina do diagnóstico molecular das distrofinopatias.

Os restantes casos pensa-se serem causados por uma combinação de mutações pontuais (resultantes em mutações *nonsense* ou de *frameshift*), deleções muito intrónicas ou inserções exónicas de sequências repetitivas, e que, como já foi referido, representam 20-30% do espectro mutacional. A identificação destas mutações é dificultada pelo tamanho do gene da distrofina, pela presença de vários promotores, pelo rácio de sequência intrónica *versus* exónica e pelo elevado nº de polimorfismos (não causais).

Uma das técnicas utilizadas é o PTT (*Protein Truncation Test*) aplicado ao estudo do mRNA, já que a maioria das alterações pontuais encontradas são mutações *nonsense* ou de pequenas deleções e duplicações que originam *frameshift*, e mutações em locais de *splicing* (Roest *et al.*, 1993; Gardner *et al.*, 1995; Tuffery-Giraud *et al.*, 1999 e 2004). A vantagem do PTT é que é aplicada a maioria das mutações pontuais (as que originam uma proteína truncada), a análise do mRNA reduz o tamanho da sequência a estudar, mas é exigente pois requer a utilização de RNA extraído de biópsia muscular. As abordagens por

mRNA (RT-PCR, por exemplo), excepto quando seguidas de sequenciação sistemática, também não permitem a identificação de mutações *missense* que, embora raramente, que têm sido descritas (Derbugrave *et al.*, 2007).

Outras técnicas como DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Dolinsky *et al.*, 2002; Hofstra *et al.*, 2004), detecção de mutações virtualmente (DOVAM-S) (Buzin *et al.*, 2005), e dHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) (Bennet *et al.*, 2001) seguida de sequenciação, têm permitido a detecção de pequenas mutações em quase todos os 79 exões. Apesar destas técnicas terem limitações na detecção de duplicações, têm sido uma mais valia na detecção de mutações *missense*.

Mais recentemente, verificaram-se avanços técnicos na sequenciação automática e, consequentemente, o surgimento de um protocolo para análise de sequenciação rápida directa a partir de DNA genómico (UCDS - *universal condition direct sequencing*). Este método, desenvolvido por Bennet e colaboradores (2001), baseia-se na amplificação de todos os exões utilizando uma única condição de amplificação, tanto do PCR simétrico como da reacção de sequenciação, e que permitiu otimizar os dados de sequenciação, simplificar a caracterização molecular, diminuir o custo associado a este procedimento, e apresentar-se de grande utilidade em laboratórios com facilidades no processamento de amostras de sequenciação (Hamed *et al.*, 2006; Flanigan *et al.*, 2003). Os *primers* normalmente incluem as sequências exónicas e as fronteiras exão/intrão, mas falham no reconhecimento de mutações muito intrónicas. Este método detecta alterações na sequência perto de locais de *splicing* mas não permite interpretar a sua consequência funcional.

A análise bioinformática permite determinar a variação do *score* dos locais de *splicing* quando sofrem uma mutação, mas não consegue prever com exactidão se ocorrerá o *skipping* desse exão ou se o uso de um local crítico de *splicing* próximo da mutação.

Devido à importância da estrutura e quantidade residual de mRNA de distrofina na determinação do fenótipo, os estudos do mRNA, quer a nível de sequenciação, quer a nível da quantificação da sua expressão, são, nestes casos, um passo complementar essencial.

1.10. Correlação genótipo/ fenótipo

1.10.1. Delecções e duplicações

Mónaco e colaboradores (1988) desenvolveram uma hipótese explicativa para os factores de distinção molecular entre o fenótipo DMD e BMD, e que tem como base a manutenção ou não da grelha de leitura do gene. Os doentes com DMD tipicamente apresentam mutações *out-of-frame*, que se prevê produzir uma proteína truncada e presumivelmente instável, originando a perda da sua expressão e funcionalidade. Por sua vez, os pacientes com BMD apresentam mutações *in-frame* que, apesar de produzir uma proteína internamente delectada ou duplicada, mantêm a grelha de leitura e originam uma distrofina semi-funcional.

Trabalhos seguintes vieram consolidar esta hipótese, com 92% das delecções encaixando na regra do *reading frame* (Gillard *et al.*, 1989; Koenig *et al.*, 1989). As restantes 8% estão essencialmente concentradas numa região na extremidade 5' do gene, onde a perda dos exões 3-7 resulta em BMD, em DMD ou fenótipo intermediário (Malhotra *et al.*, 1988; Koenig *et al.*, 1989; Aartsma-Rus *et al.*, 2006; Kesari *et al.*, 2008).

No caso das delecções *in-frame*, estudos enfatizam a hipótese da localização e do tamanho da delecção apresentarem igualmente uma influência fenotípica (Koenig *et al.*, 1989; Beggs *et al.*, 1991; Arikawa-hirasawa *et al.*, 1995; Fanin *et al.*, 1996).

No domínio *Central-Rod*, Beggs e colaboradores (1991) descrevem que delecções *in-frame* muito extensas causam invariavelmente um fenótipo DMD, enquanto que delecções que removem apenas a primeira parte do domínio têm sido descrita em doentes assintomáticos, em indivíduos com CKs elevados e apenas com queixas de cáimbras musculares após exercício, sugerindo que pelo menos uma pequena parte do domínio *Central-Rod* é necessário para uma função proteica adequada.

Delecções *in-frame* localizadas no domínio ligação à actina causam BMD grave, enquanto que delecções que removem ambos os domínios da actina e parte do domínio *Central-Rod* usualmente causam DMD (Vainzof *et al.*, 1993; Arikawa-hirasawa *et al.*, 1995; Fanin *et al.*, 1996). Isto pode ser explicado pela presença de um local adicional de ligação à actina no domínio *Central Rod* (Rybakova *et al.*, 1996). A remoção dos 3 primeiros locais de ligação

à actina (localizados no domínio de ligação actina) podem ser parcialmente compensados pelo domínio *Central Rod* e causar BMD grave, enquanto que a deleção dos 4 locais resulta em DMD.

Por sua vez, deleções no domínio cisteínico nunca foram descritos em pacientes BMD, indicando que este domínio é indispensável na função da distrofina (Bies *et al.*, 1992a; Rafael *et al.*, 1996).

Relativamente ao domínio C-Terminal, deleções entre exões 71-74 (local de ligação da sintrofina) causam BMD e deleções no exão 74 ou a jusante são detectadas em pacientes com BMD e DMD.

A figura seguinte (Figura 1.5) resume esta correlação entre fenótipo e deleções *in-frame*.

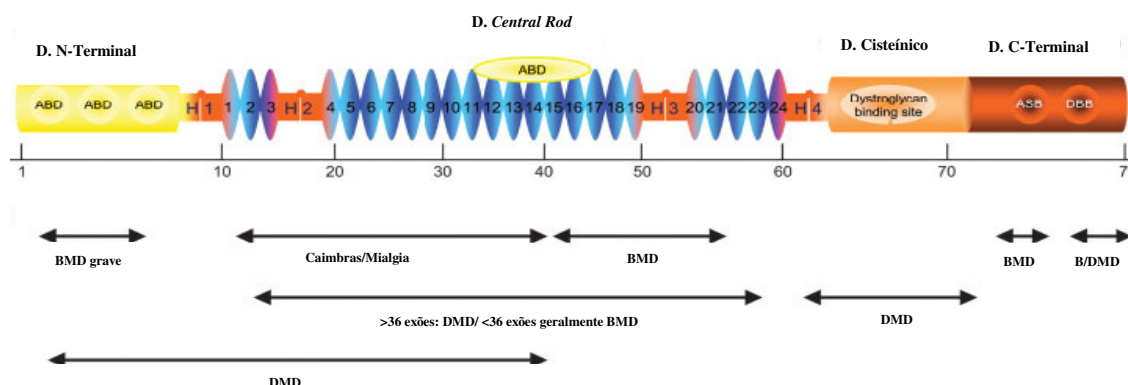


Figura 1.5 – Representação gráfica da relação entre a localização das deleções *in-frame* e o fenótipo.

Em *Muscle Nerve* 2006; **34**: 135–144.

1.10.2. Mutações pontuais

De uma forma geral, as mutações *nonsense* ou as pequenas deleções ou inserções que provocam *frameshift* são características de um fenótipo DMD. No entanto, este tipo de mutações é por vezes descrito em doentes BMD (Fajkusová *et al.*, 2001; Derbugrave *et al.*, 2007). Na literatura, estão descritos casos de mutações *nonsense* nos exões 27, 29 e 31 descritos em doentes com BMD (que previsivelmente teriam um fenótipo DMD, dado originarem uma proteína truncada e, logo, não funcional). Nestes casos, verificou-se que

estas mutações exónicas causam o *skipping* dos exões 27, 29 e 31 resultando numa mutação *in-frame* e, logo, num fenótipo menos severo (Shiga *et al.*, 1997; Ginjaar *et al.*, 2000; Dissel *et al.*, 2006). Estas mutações ocorrem em ESEs (*Exonic Splicing Enhancers*), que representam motivos envolvidos na definição do exão e que, se mutados, afectam o perfil do *splicing* da distrofina. Nestes casos, a maquinaria de *splicing* omite o exão *in-frame*. Nestes pacientes, podem ser detectados níveis significativos de distrofina sem os aminoácidos codificados pelo exão 27 ou 29 ou 31.

1.11. Aconselhamento genético

Como já foi referido, apenas um terço das mutações no gene *DMD* são esporádicas, e dadas as características fenotípicas desta doença, a identificação do estatuto de portadoras e o diagnóstico pré-natal revela-se extremamente importante para os familiares do doente. Para as famílias sem mutação identificada, o aconselhamento genético baseia-se na análise por haplotipagem, baseada na co-transmissão do gene mutado e nas variações polimórficas do DNA localizadas próximas ou no interior do gene *DMD*. Este método permite apenas determinar se uma eventual portadora herdou o mesmo cromossoma X do seu familiar afectado. No entanto, esta abordagem é limitada pela possibilidade de recombinação entre sequências polimórficas e a mutação desconhecida, pela presença de mutações esporádicas e pela disponibilidade de membros da família (Prior *et al.*, 2005).

Por outro lado, mesmo com mutação identificada é necessário alguma precaução nesta avaliação. Estudos realizados por Bakker *et al.* (1987) e van Essen *et al.* (1992), estimam um risco de 20% de mosaicismo gonadal. Este facto tem implicações a nível do aconselhamento genético pois é muito importante considerar o risco de recorrência nos casos em que a mãe não é portadora a nível somático e em que os casos aparentam ser mutações *de novo*.

1.12. Gestão e tratamento da doença

Apesar do aconselhamento genético ser capaz de reduzir a prevalência de uma patologia numa determinada família, existe uma grande necessidade de desenvolver tratamentos adequados aos pacientes com distrofinopatias e, até à data, já foram exploradas várias abordagens.

O tratamento tradicional, e pelo facto de não existir cura para esta patologia, tem como principal ênfase os cuidados a nível do aparelho respiratório e cardíaco. A insuficiência respiratória pode ser tratada com o recurso a ventilação assistida e traqueotomia electiva (para assegurar uma função pulmonar adequada), permitindo aos doentes com DMD sobreviverem até à terceira década de vida (Emery, 2002). Também a utilização de métodos de detecção como a electrocardiografia e ecocardiografia é essencial na detecção precoce da cardiomiopatia nestes doentes. O tratamento dos sintomas da cardiomiopatia inclui o uso convencional de diuréticos, inibidores da enzima convertora da angiotensina, entre outros (Emery, 2002).

Está ainda descrito que a administração de glucocorticoides pode diminuir o grau de progressão da doença, embora por um período de tempo relativamente curto.

1.13. Novas oportunidades de tratamento

O desenvolvimento da terapia génica foi bastante auxiliado pela descoberta de um homólogo natural genético do *DMD*: o ratinho *mdx* (Bulfield, 1984). O *mdx* é deficiente em distrofina devido a uma mutação pontual que origina um codão stop prematuro, e a produção de um péptido instável (Sicinski *et al.*, 1989). A expressão da distrofina pode ser restaurada nos ratinhos *mdx* por várias vias, como administração de medicamentos, uso de oligonucleótidos quimeras e *anti-sense* e transplantação de células.

Administração de antibióticos

Barton-Davis *et al.* (1999) e Arakawa *et al.* (2003), observaram que a administração de elevadas doses de antibiótico aminoglicosídeo, como gentamicina e negamicina, pode levar

a uma expressão substancial da distrofina, através da não leitura do codão stop criado pela mutação no ratinho *mdx*. Esta abordagem pode ser aplicada aos cerca de 15% dos casos DMD com mutações *nonsense*. No entanto, os resultados dos ensaios clínicos preliminares não foram muito promissórios (Dumant *et al.*, 2003).

Os oligonucleótidos quimeras de RNA/DNA também podem ser utilizados para induzir alterações de uma única base no genoma do hospedeiro (reparação génica). O motivo de RNA leva a um aumento da ligação do oligonucleótido à região específica do DNA e encoraja o *mismatch repair* (uma actividade nuclear normal para reparar o DNA). Usando esta técnica, Rando *et al.* (2000) e Bertoni *et al.* (2003), demonstraram a reparação do gene em algumas fibras musculares do ratinho *mdx* após administração intramuscular. Resultados semelhantes foram obtidos na distrofia muscular canina do Golden Retriever, outro modelo de DMD (Bartlett, 2000).

Transplantação celular (mioblastos)

A transplantação celular com células precursoras do músculo de um dador oferece, não só a introdução de um gene da distrofina funcional no músculo distrófico, mas também a reposição da *pool* de mioblastos, importante para a regeneração das fibras danificadas. No entanto, esta abordagem é limitada ao local natural de fornecimento celular e pela resposta imuno às células do dador.

Terapia com células estaminais

Estudos efectuados com células estaminais auto-renováveis e imuno-privilegiadas, verificaram que proliferam durante mais tempo que os mioblastos, migram para o sistema circulatório após injeção intra-arterial, e são mais eficazes que os mioblastos a nível da regeneração muscular e expressão da distrofina após implantação (Peng & Huard, 2004).

Modificação do transcrito de um gene mutado – oligonucleótidos antisense

Uma abordagem alternativa é promover o *skipping* do exão alterado, um processo que se pensa ser responsável pela presença das fibras revertidas positivas para a distrofina em doentes com DMD (Winnard *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2000; Hoffman & Drissman, 2001), e

cujas descobertas permitiu guiar o uso dos oligonucleótidos antisense para a terapia da DMD (van Deutekom *et al.*, 2003).

Os oligonucleótidos *antisense* podem alterar a expressão do gene por hibridização com as sequências mRNA alvo em locais como as junções exão-intrão, codões de inibição da tradução e sequências a jusante do codão de iniciação.

Ao favorecer o *splicing* aberrante de regiões não contínuas do exão, o efeito da mutação *nonsense* é ultrapassado e é produzida uma proteína distrofina com suficientes domínios funcionais.

Vários estudos demonstraram que o *skipping* de exões pode ser induzido com oligonucleótidos nas células em cultura do ratinho *mdx* (Dunckley *et al.*, 1998; Wilton, 1999), no próprio ratinho *mdx* (Lu *et al.*, 2003) e em células musculares de pacientes com DMD (Aartsma-rus *et al.*, 2003), e nos próprios doentes (van Deutekom *et al.*, 2007).

Investigações mais recentes em *skipping* de multi-exões alargaram o espectro de mutações susceptíveis de “reparação” (Aartsma-rus *et al.*, 2004 e 2007).

Esta abordagem é promissora e pode ser adaptada ao genótipo do paciente (isto é, ao local preciso da mutação) de forma a promover a formação de um transcrito *in-frame*, e assim ser aplicada a muitos dos pacientes.

Sobre-regulação: a utrofina

A sobre-regulação é baseada no aumento da expressão de genes alternativos de forma a substituir o gene mutado. A sobre-regulação da utrofina, um homólogo da distrofina, tem sido estudada como potencial terapêutica da DMD (van Deutekom *et al.*, 2003; Nowak *et al.*, 2004). Quando a utrofina está sobre-expressa nos ratinhos *mdx* transgênicos, localiza-se no sarcolema das células musculares e restaura os componentes do DGC, que impede o desenvolvimento distrófico e consequentemente, melhora a capacidade funcional do músculo esquelético (Rybakova *et al.*, 2002).

Experiências de aumento de expressão de outros genes também têm sido bem sucedido em melhorar a patologia de células musculares do *mdx*, nomeadamente o NOS (sintase de óxido nítrico), l-arginine, galgt2, igf1, calpastatina, entre outros (Nowak *et al.*, 2004).

Vectores virais

Outra área em investigação refere-se ao uso de vectores adenovíricos transportadores de regiões críticas do gene *DMD*. Devido ao tamanho do gene, apenas um pequeno transcrito pode ser incorporado nos vectores víricos disponíveis, tendo sido, por este facto, criado microdistrofinas e minidistrofinas na tentativa de restaurar a expressão da distrofina no ratinho *mdx*. Existem algumas investigações semelhantes aplicadas a vectores plasmídicos não-víricos.

1.14. Objectivos

Este trabalho focou-se na caracterização molecular de doentes com Distrofia Muscular de Duchenne / Becker, tendo como principais objectivos:

- a) A pesquisa de mutações pontuais com doentes com suspeita de DMD e BMD e com diagnóstico molecular de rotina negativo.
- b) Optimizar uma abordagem molecular complementar às técnicas de rotina do diagnóstico molecular, aplicada a doentes com apresentação muito sugestiva.
- c) Estudar o impacto das mutações encontradas as nível do RNA mensageiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostra seleccionada

Este estudo incidiu sobre 25 casos de doentes com diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne/Becker, nos quais foi previamente excluída a presença de grandes deleções ou duplicações através da utilização de *Southern Blot*, PCR multiplex e/ou MLPA.

Os critérios de selecção basearam-se no exame clínico, nos valores de CK, na história familiar de doença ligada ao X e/ou na avaliação histológica e imunohistoquímica da biópsia muscular. A informação disponível para cada um dos casos/famílias encontra-se referenciada na tabela 2.1.

Em todos os doentes estudados não são conhecidos parentescos entre as respectivas famílias.

Tabela 2.1.Resumo das características clínicas, imunohistoquímicas e laboratoriais dos doentes estudados.

<i>Caso</i>	<i>I.D.</i>	<i>H.F?</i>	<i>Estudo imunohistoquímico</i>	<i>Dados Clínicos</i>	<i>Fenótipo</i>
003	5A	sim	Alt. distróficas graves - diagnóstico de DMD	n.d.	DMD
024	n.d.	sim	n.d.	Fraqueza muscular	DMD/BMD
133	n.d.	não	DYS1 e 2: 0 e DYS3: N → DMB	Dificuldade de marcha, sem atraso mental, CKs elevados	DMD/BMD
217	2A	sim	DYS: anormal → DMD	Atraso motor, atraso de desenvolvimento, macrocefalia, dificuldades de marcha	DMD
231	n.d.	não	DYS:0; SGs:N → DMD	miopatia	DMD
274	16M	sim	DYS 0 → DMD	n.d.	DMD
299		não	DYS 0 → DMD	n.d.	DMD/BMD
301	10A	sim	n.d.	Perda progressiva de força nos 4 membros compatível com distrofia, hipertrofia dos gémeos	DMD/BMD
309	n.d.	não	n.d.	Fraqueza muscular progressiva	DMD/BMD
311	5A	não	Dys1,2: tenue ; DYS3:quase 0 → BMD	Miopatia, pseudohipertrofia gémeos, Perda marcha aos 11 anos, CKs12000; ligeiro atraso mental, alterações ecocardiográficas.	DMD
328	7A	não	DYS 1,2,3: 0 → DMD	n.d.	DMD
333	n.d.	não	Dys1,2,3: fraca e irregular; SGs- α , β , γ : fraca e irregular; SG- δ : N; → possível distrofinopatia	CKs 12.000;	DMD/BMD
341	5A	sim	Dys2,3:ténue e irregular; SG- γ : túnue e irregular	Perda de marcha aos 7anos e meio	DMD
346	n.d.	sim	DYS:0 → Distrofia muscular progressiva	Clínica compatível com DMD, surdez neurosensorial, atraso mental	DMD/BMD
368	n.d.	não	DYS1,2,3:0 → DMD	Fraqueza muscular proximal progressiva, dificuldade em caminhar, atraso mental, hipertrofia dos gémeos, Gowers positivo; CKs 30.000	DMD
370	5A	não	DYS 0 → DMD	Gowers positivo, reflexos normais, mãe com CKs normais	DMD/BMD
371	n.d.	sim	DYS1: túnue; DYS2 e 3: 0; α , β e δ -SGs: dim. → Distrofinopatia	n.d.	DMD/BMD
379	1A	não	DYS1,2,3:0 → DMD	Trissomia 21, hipertrofia dos gémeos	DMD
404	3A	não	DYS e SGs: marcação irregular e fraca → Distrofia muscular progressiva: distrofinopatia	Perda força muscular, Gowers positivo, hipertrofia gémeos com rotação negativa, CKs elevados; EMG miopático, ADPM	DMD/BMD
412	10M	não	DYS1:0; DYS2:N (em algumas fibras); DYS3:ténue; SGs: túnue e irregular → DMD	Assintomático: CK:32775	DMD
413	n.d.	não	DYS dim; SG dim.	CPKs 16.000; fraqueza distal; músculo não hipertrofico; sem atraso mental	DMD/BMD
415	1A	não	Dys1,2,3:ausente; SGs: irregulares→DMD	n.d.	DMD
421	n.d.	não	DYS1e3:0; DYS2:tenue e irreg; SGs: irregular	Miopatia	DMD/BMD
442	4A	não	DYS1,2,3:0 → DMD	Marcha balanceada; hipertrofia gémeos; dificuldade em subir escadas; Gowers positivo	DMD
445	9A	não	DYS1,2,3: parcialmente evidenciadas; SGs:N → BMD	n.d.	BMD

I.D. – Idade de diagnóstico; H.F. – história familiar; CK -creatina cinase; DMD-distrofia muscular de Duchenne; BMD – Distrofia Muscular de Becker; n.d. – não disponível; EMG – Electromiografia; SGs – sarcoglicanos; ADPM-atraso desenvolvimento psico-motor; DYS1,2,3: anticorpos para marcação da distrofina; N – Normal; 0 – ausente (sem marcação); dim. – diminuído; A – anos, M – meses;

2.2. Material biológico

Para a realização do estudo molecular utilizou-se sangue periférico e biópsia muscular criopreservada como material biológico.

2.3. Extracção de DNA

O DNA genómico foi obtido a partir do sangue periférico, extraído pelo método de *salting-out* (Miller *et al.*, 1988).

Resumidamente, este procedimento consiste nos seguintes passos: 1) Adição de uma solução que permite a lise dos eritrócitos; 2) Adição de uma solução que lisa os núcleos dos linfócitos; 3) Digestão das proteínas por acção de proteinase K e de uma solução detergente; 4) Precipitação das proteínas e restos celulares por acção de uma solução saturada de cloreto de sódio; 5) Isolamento do DNA por precipitação em etanol absoluto; 6) Hidratação do DNA em tampão apropriado.

O procedimento referente a este método encontra-se detalhado em anexo (Anexo 7.1).

A determinação da concentração e pureza do DNA foi realizada no espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (a razão Abs_{260}/Abs_{280} deverá ser 1.8).

2.4. Extracção de RNA

O RNA mensageiro foi obtido a partir de material de biópsia muscular (entre 10-40mg) extraído pelo kit VERSAGENE RNA *Fibrous Tissue Purification Kit*, e aplicando o protocolo fornecido pelo fabricante (Anexo 7.1).

A integridade do RNA foi verificada por electroforese em gel de agarose 0,8%/TAE (m/v). Procedeu-se igualmente à determinação da concentração e da pureza do RNA obtido utilizando o espectrofotómetro NanoDropND-1000 (a razão Abs_{260}/Abs_{280} deverá estar compreendida entre 1.8 e 2.0).

2.5. Estudo de haplotipagem

Para os casos com história familiar positiva de distrofia muscular e com disponibilidade de estudar os familiares, foi efectuado um estudo de haplotipagem para o gene *DMD*. Para tal

foram utilizados 15 marcadores polimórficos intragênicos marcados com diferentes fluorocromos. De acordo com o tamanho dos fragmentos realizou-se uma combinação de 4 misturas de marcadores, cujas características se encontram resumidas na tabela seguinte (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Descrição dos marcadores utilizados na análise de haplotipagem.

PAINEL 1					
Marcador	Nº DXS	Fluorocromo	Tamanho (pb)	Localização	Referência
DMDSTR 44	DXS1238	NED TM	174-204	Intrão 44	Clemens <i>et al.</i> (1991)
DMDSTR 45	DXS1237	6FAM TM	156-184	Intrão 45	Clemens <i>et al.</i> (1991)
DMDSTR 49	DXS1236	HEX TM	227-257	Intrão 49	Clemens <i>et al.</i> (1991)
DMDSTR 50	DXS1235	6FAM TM	233-251	Intrão 50	Clemens <i>et al.</i> (1991)
PAINEL 2					
Marcador	Nº DXS	Fluorocromo	Tamanho	Localização	Referência
MP1P	DXS503	6FAM TM	78/82	Exão 79	Abbs, Roberts (1990)
3'DysMSC	DXS1234	HEX TM	129-135	Exão 79	Oudet, Beggs (1990)
5'DysII	DXS1242	6FAM TM	214-228	5' Exão 1	Feener <i>et al.</i> (1991)
5'DysIII	-----	NED TM	219-225	PM 5' Dp427c	Feener <i>et al.</i> (1991)
PAINEL 3					
Marcador	Nº DXS	Fluorocromo	Tamanho	Localização	Referência
DMDSTR07A	---	6FAM TM	218-235	Intrão 7	BD Leiden
DMDSTR07B	---	HEX TM	227-241	Intrão 7	BD Leiden
P20	DXS269	NED TM	216-241	Intrão 44	BD Leiden
3'DMD1-2c	DXS1241	6FAM TM	245-255	Intrão 59	Powell <i>et al.</i> (1991)
PAINEL 4					
Marcador	Nº DXS	Fluorocromo	Tamanho	Localização	Referência
5'- 5n3	----	6FAM TM	112-130	Intrão 2	King (1994, 1995)
5'- 7n	---	6FAM TM	165-173	Intrão 25	King (1995)
3'-19n8	---	HEX TM	148-158	3' Exão 63	King (1994, 1995)

pb – pares de base; BD Leiden – Base de dados do locus *DMD* sediada em Leiden (<http://www.dmd.nl>).

Para realizar esta análise, adicionou-se a 8 µl de 2X *Qiagen PCR Master Mix* (constituída por *Hotstar Taq® DNA polimerase*, dNTPs e 6mM MgCl₂), 1 µl da mistura de marcadores, 1 µl de gDNA (100 ng/µl) e água para um volume final de 15 µl.

O programa de PCR foi composto por uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de: 1 minuto a 95°C, uma rampa de descida de 2 minutos até 54°C, 1 minuto a 54°C, seguido de 2 minutos a 72°C. A extensão final foi de 10 minutos a 72°C, no termociclador 9600 (Applied Biosystems). 1 µl de produto resultante do PCR foi adicionado a 15 µl de formamida desionizada contendo 0,5 µl de padrão interno

(*GeneScanTM 500 ROXTM Size Standard*), desnaturado durante 5 minutos a 95°C e arrefecidos de imediato.

De forma a determinar os tamanhos dos alelos, esta mistura resultante foi submetida a electroforese capilar no sequenciador automático *ABI3130xl* (Applied Biosystems), e o tamanho dos fragmentos foi determinado utilizando a aplicação *GeneMapper* v.4.0 (Applied Biosystems) para análise de fragmentos, segundo instruções do respectivo manual.

De acordo com os alelos observados, foram construídos os haplótipos familiares, presumindo o menor número de recombinações possíveis.

A descrição da sequência dos primers e misturas dos marcadores estão descritos no Anexo 7.2.

2.6. Estudo do gene *DMD*

Na abordagem de sequenciação do DNA genómico, a amplificação dos exões e junção exão-intrão do gene da distrofina, foi efectuada utilizando primers específicos disponíveis no *Kit* de amplificação do gene *DMD*: *VariantSeqrTM Resequencing System* (RSS000009309_03) da Applied Biosystems. Este kit inclui também algumas regiões intrónicas do gene. Para as regiões exónicas não cobertas por este kit, foram desenhados primers específicos com o auxílio do programa *Primer Express[®] v.2.0* (Applied Biosystems) e *FastPCR[®]* (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Descrição dos primers desenhados para o estudo do gene *DMD*

Região	Tamanho do fragmento (pb)		Sequência do primer (5'→ 3')
Exão 1	320	F	TGTAACACGACGGCCAGTTTGACTCACTCAGTGTGGGATC
		R	CAGGAAACAGCTATGACCGTGAGCTTGTACAACTAAACG
Exão 23	618	F	TGTAACACGACGGCCAGTTCAGTAAATAGATGCACCAAAAC
		R	CAGGAAACAGCTATGACCGAAAGATGCTGAAGGTCAAATG
Exão 33	331	F	TGTAACACGACGGCCAGTCTAGATATTGACCACCGCTGC
		R	CAGGAAACAGCTATGACCTTTGTGGTCTCAGCATGCAC
Exão 39	472	F	TGTAACACGACGGCCAGTAAAGAAAGGCTATGAGCACAGTATC
		R	CAGGAAACAGCTATGACCCATCGTTCAAATCAAATACCACTC
Exão 44	486	F	TGTAACACGACGGCCAGTAGGGAAAATTGCAACCTTCC
		R	CAGGAAACAGCTATGACCTCCATCACCTTCAGAACCTG
Exão 77	434	F	TGTAACACGACGGCCAGTTATACAGTTTTTTTTTCTCCAAGGG
		R	CAGGAAACAGCTATGACCTGCCATTCTGATACTGCGTG

pb – Pares de bases

2.6.1. Amplificação do gDNA

A amplificação dos fragmentos do kit *VariantSEQR*TM, foi efectuada utilizando Amplitaq Gold[®] Master Mix 2x. A 5 µl desta mix (que inclui GeneAmp[®] PCR Gold Buffer, Tris/HCl pH 8.05, KCl, dNTPs, MgCl₂, e estabilizadores) adicionou-se 1,6 µl Glicerol 50% (v/v), 2 µl de *Primers* (*VariantSEQR*TM *Resequencing System* à concentração enviada pelo fabricante), 1 µl gDNA (20 ng/µl) e água para um volume final de 10 µl. Submeteu-se a mistura final ao seguinte ciclo de temperaturas: uma desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C, e uma extensão final de 10 minutos de 72°C, no termociclador 9800 *Fast PCR System* (Applied Biosystems).

A amplificação dos fragmentos dos primers desenhados separadamente do kit foi efectuada utilizando 10 µl de *PCR Master Mix* (Promega) à qual foi adicionada 1 µl de cada primer (10pmol/µl), 1 µl gDNA (50 ng/µl) e água para um volume final de 20 µl. Utilizou-se as mesmas condições de PCR utilizadas na amplificação dos fragmentos do kit *VariantSEQR*TM.

A verificação do funcionamento do PCR foi efectuada por electroforese num gel de agarose 2%/TAE (m/v), onde se aplicou 2 µl de cada amostra juntamente com 1 µl de *Loading buffer*. Comparou-se com 2 µl do marcador de peso molecular *Low DNA mass ladder* (Invitrogen) a fim de se calcular aproximadamente a concentração dos produtos de PCR.

2.6.2. Purificação dos produtos PCR

Os produtos de PCR foram purificados pelo método enzimático utilizando o kit ExoSap-IT[®], de forma a eliminar os primers não incorporados e/ou amplificações inespecíficas. Para tal, adicionou-se 1 µl de ExoSap-IT[®] a cada 4 µl de produto PCR, e incubou-se a 37°C durante 15 minutos, seguida de uma incubação a 80°C durante 15 minutos, para inactivação das enzimas.

2.6.3. Reacção de sequenciação

Para a reacção de sequenciação, utilizou-se 2 µl *Big Dye*[®] *Terminator v1.1 Cycle Sequencing Mix* (que contém MgCl₂, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorocromos e

AmpliTaq DNA polimerase), 1,5 µl de *primer M13* (F ou R) a 5 pmol/µl, 5 µl de produto PCR purificado e água para um volume final de 10 µl.

O programa incluiu uma desnaturação inicial de 1 minutos a 96°C, seguida de 27 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 1 minuto e 15 segundos a 60°C, e de uma extensão final de 5 minutos a 60°C, no termociclador *9800 Fast PCR System* (Applied Biosystems).

2.6.4. Purificação dos produtos de sequenciação

Os produtos de sequenciação foram purificados utilizando o kit *DyeEX 96* (Qiagen), de forma a eliminar os dNTPs e ddNTPs não incorporados e sais que pudessem interferir com a electroforese capilar.

2.6.5. Electroforese capilar

Os produtos purificados foram ressuspensos em 20 µl de formamida desionizada (formamida *Hi-DiTM*) por agitação no vortex e deixando dissolver durante 10 minutos.

A separação dos fragmentos foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático *ABI3130xl* (Applied Biosystems), e os resultados foram analisados no programa *SeqScapeTM* v.2.5 (Applied Biosystems).

2.7. Análise da expressão do gene *DMD* a nível do mRNA

O estudo da expressão do gene a nível do mRNA foi realizado por RT-PCR (Reverse-Transcriptase PCR), utilizando o kit *SuperScriptTM One-Step RT-PCR* com *Taq platinum[®]* (Invitrogen), que realiza a síntese de cDNA e respectiva amplificação numa só reacção. A 25 µl da mistura de reacção, adicionou-se 250 ng de RNA, 1 µl de cada primer a 10 pmol/µl, 1 µl da mistura das enzimas (*Transcriptase reverse* e *Taq DNA polimerase Platinum[®]*) e água para um volume total de reacção de 50 µl. A sequência dos primers utilizados encontra-se descrita em anexo (Anexo 7.2).

A síntese de cDNA ocorreu a 50°C durante 30 minutos e o programa de amplificação consistiu numa desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 30

segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e 2 minutos a 72°C, no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

O resultado da amplificação foi verificado por electroforese em gel agarose 2%/TAE (m/v). Os produtos que apresentavam uma fraca amplificação foram submetidos a um PCR *nested*. A amplificação dos fragmentos por PCR *nested* foi efectuada utilizando primers específicos a cerca de 20 nucleótidos a jusante dos primers usados no RT-PCR. A 25 µl de *PCR Master Mix* (Promega) adicionou-se 1 µl de cada primer a 10 pmol/ µl, 1-5 µl de produto de PCR e água para um volume final de 50 µl. A amplificação englobou uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C, no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). A sequência dos primers utilizados encontra-se descrita em anexo (Anexo 7.2).

A verificação do funcionamento e a purificação do produto PCR foi realizado tal como se refere no ponto 2.6.

Para a reacção de sequenciação, utilizou-se 2 µl *Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Mix* (que contém MgCl₂, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorocromos e *AmpliTaQ DNA polimerase*), 1,5 µl de uns dos *primers* a 2,5 pmol/µl, 5 µl de produto PCR purificado e água para um volume final de 10 µl.

O programa incluiu uma desnaturação inicial de 6 minutos a 94°C, seguida de 27 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos de extensão a 60°C, e de uma extensão final de 10 minutos a 60°C, no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

A purificação dos produtos de sequenciação, a electroforese capilar e a análise da sequenciação foi semelhante à descrita no ponto 2.6.

2.8. Rastreio populacional

Para um dos casos estudados, foi encontrada uma variação não descrita com dúvida de ser causal, pelo que se efectuou um rastreio populacional. Pelo facto da nova variação detectada constituir a deleção de 3 nucleótidos procedeu-se a um estudo baseado em análise de fragmentos. Foram desenhados primers específicos para o exão em causa (exão

70) utilizando o programa *Primer Express*[®] v.2.0 (Applied Biosystems) e aos quais foram adicionadas caudas M13. A tabela 2.4 descreve os primers utilizados. Esta análise foi aplicada ao caso em estudo (controlo positivo) e a 240 controlos do sexo masculino.

Tabela 2.4 – Descrição dos primers utilizados no rastreio populacional

<i>Região</i>	<i>Tamanho do fragmento (pb)</i>		<i>Sequência (5'→3')</i>
Exão 70	307	F	TGTAACAAACGACGGCCAGTGGGCAGAAGACTGGAGTGGTC
		R	CAGGAAACAGCTATGACCCTGTTTGCATTGTTGGAGTGAAG

pb – pares de bases

A amplificação, a verificação do funcionamento e a purificação dos produtos PCR foi efectuada conforme já descrito nos pontos 2.6.1, 2.6.2 e 2.6.3, respectivamente.

A partir do produto resultante purificado, realizou-se um segundo PCR, ao qual foi adicionado 10 µl de *PCR Master Mix* (Promega), 1 µl de primer *M13-F* a 10pmol/ µl (marcado com o fluorocromo HEXTM) e 1 µl de primer *M13-R* a 10pmol/ µl, e água para um volume final de 20 µl. Esta mistura foi submetida a um PCR nas mesmas condições do anterior.

1 µl do produto amplificado foi adicionado a 15 µl de formamida desionizada e 0,2 de padrão interno (*GeneScan*TM 500 ROXTM Size Standard), desnaturados durante 3 minutos e arrefecidos de imediato e submetidos a electroforese capilar no sequenciador automático *ABI3130xl*. O tamanho dos fragmentos foi determinado usando o programa *GeneMapper* v.4.0.

2.9. Análise Bioinformática

O desenho de primers específicos foi efectuado no programa *Primer Express*[®] (Applied Biosystems), software que permite o desenho e a verificação da qualidade dos primers, no que diz respeito à temperatura de *melting*, formação de estruturas secundárias e formação de dímeros de primers.

A análise dos resultados de sequenciação foi efectuada no programa *SeqScape*TM v.2.5.

Para a previsão das alterações de *splicing* recorreu-se ao programa *Human Splicing Analyser* (<http://www.umd.be/HSF/>), que pesquisa sequências de acordo com matrizes de similariedade, determinadas anteriormente por Cartegni *et al.* (2003), Sironi *et al.* (2004),

Wang *et al.* (2004), Goren *et al.* (2006) e Zhang *et al.* (2008), e que estão associadas a elementos que influenciam o processo de splicing do pré-mRNA.

A comparação da homologia de sequências aminoacídicas foi efectuada recorrendo ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI, *protein-protein blast* (<http://www.ncbi.nlm.gov/Blast>) e o alinhamento das sequências seleccionadas foi realizado no programa ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk/clustalx>).

2.10. Nomenclatura das mutações e base de dados

As variações de sequência detectadas foram descritas de acordo com as recomendações de nomenclatura de mutações da *Human Gene Variation Society* (HGVS) (den Dunnen & Antonarakis, 2001).

Foi utilizada a sequência de referência de cDNA para o gene *DMD* descrita no *RefSeq Project* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): NM_004006.1.

Na pesquisa de variações já descritas foi consultada a literatura e a base de dados específica do *locus DMD* (DB Leiden), disponível na página *Leiden Muscular Dystrophy* (<http://www.dmd.nl>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos 25 casos seleccionados para este estudo, foram detectadas 22 mutações, o que corresponde a uma positividade de 88%. Foram encontradas 6 mutações *nonsense*, 9 mutações *frameshift* (pequenas deleções e pequenas inserções), 6 mutações em locais de *splicing*, e 1 deleção de um codão. Destas alterações, 11 não se encontravam descritas na literatura ou na base de dados do locus da *DMD* (<http://www.dmd.nl>), o que corresponde a uma percentagem de novas mutações de 50%.

Estes resultados estão esquematizados na Figura 3.1. Não se verificou recorrência de nenhuma mutação nos casos seleccionados.

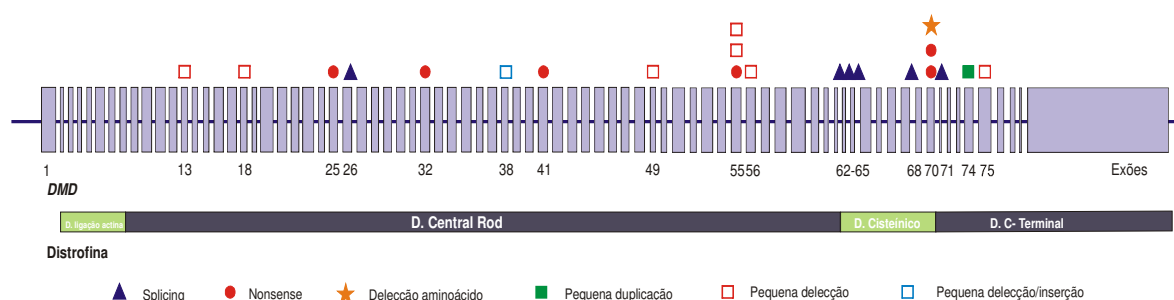


Figura 3.1 – Esquema exemplificativo das alterações encontradas, relativamente à posição no gene e domínios da proteína distrofina.

Pela análise da Figura 3.1, verifica-se que foram detectadas vários tipos de mutações predominantemente localizadas na região mais distal do gene, correspondendo aos domínios *Central Rod* distal, domínio Cisteínico e domínio C-Terminal.

3.1. Mutações que envolvem o *splicing*

A Tabela 3.1 resume os resultados obtidos relativamente a mutações que envolvem o *splicing* do pré-mRNA. De seguida, discute-se pormenorizadamente cada uma das situações.

Tabela 3.1 – Descrição das mutações que envolvem o *splicing* e dos seus diferentes efeitos a nível do mRNA – Reconhecimento de um novo local exónico críptico de *splicing*; *Skipping* total de um ou mais exões; Retenção de parte do intrão.

Código do caso	Exão /Intrão	Alterações gDNA	Efeito na proteína	Efeito no mRNA	Tipo de efeito resultante	Referência
328	Intrão 63	c.9287-1G>A	p.(Ala3096AspfsX9)	r.9287_9305del	Novo local exónico críptico	Não descrita
341	Intrão 64	c.9361+1G>A	p.(Ala3096_Leu3121delinsVal)	(r.[=,9287_9361del]	<i>Skipping</i> de exão/ exões	BD Leiden
346	Intrão 69	c.10086+2dupT	p.[Tyr3326LeufsX13; Ala3270_Pro3362del; Tyr3326_Ala3421del]	r.[9975_10086del; 3808_10086del; 9975_0262del]	<i>Skipping</i> de exão/ exões	Não descrita
368	Intrão 71	c.10223+1G>A	p.(Thr 3363SerfsX24)	r.(10087_10223del)	<i>Skipping</i> de exão/ exões	Nigro (1994)
404	Intrão 65	c.9564-1G>A	p.(Gly3189ProfsX13)	r.9564_9649del	<i>Skipping</i> de exão/ exões	Não descrita
413	Intrão 26	c.3603+3A>T	p.(Arg1202ValfsX25)	r.[=, 3603_3604ins3603+1_3603+116; 3603+3a>u]	Retenção intrónica	BD Leiden

BD Leiden – Base de dados do *locus DMD* sediada em Leiden (www.dmd.nl)

3.1.1. Mutações de *splicing* que envolve o reconhecimento de um novo local críptico exónico de *splicing*

c.9287-1G>A (Caso 328)

No caso 328 foi detectada por sequenciação genómica a alteração c.9287-1G>A no intrão 63, localizada num local de consenso de *splicing* (Figura 3.2).

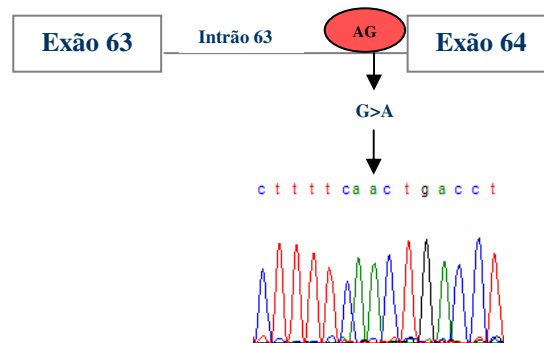


Figura 3.2 – Mutação c.9287-1G>A (caso 328). Figura representativa do local consenso de *splicing* afectado pela mutação c.9287-1G>A no intrão 63, juntamente com representação parcial da sequenciação do gDNA do caso 328.

Utilizou-se o software *Human Splicing Analyser* v.2.3 (<http://www.umd.be/HSF/>) para efectuar a previsão do *score* para este local de *splicing* e verificou-se que a presença da mutação diminui o *score* de 90,3 associado ao local para 61,35, com perda do local aceitador de *splicing*.

A fim de esclarecer o efeito desta alteração a nível da proteína, procedeu-se ao estudo do mRNA obtido a partir de biópsia muscular. A electroforese dos fragmentos amplificados em gel agarose 2%/TAE (m/v), não permitiu observar diferenças significativas de tamanho entre o fragmento mutado e um fragmento controlo, pelo que se procedeu à respectiva sequenciação.

A sequenciação do cDNA permitiu observar a deleção dos primeiros 19 nucleótidos do exão 64 (r.9287_9305del), pelo que se pode concluir que a presença da alteração c.9287-1G>A, impediu a maquinaria de *splicing* de reconhecer este local “natural” de *splicing*, tendo sido reconhecido um novo local críptico, a nível exónico, 20 nucleótidos a jusante. A análise deste novo local críptico AG pelo *Human Splicing Analyser* (<http://www.umd.be/HSF/>) permitiu verificar que este possui um *score* relativamente elevado (76,48), tendo por isso sido utilizado na ausência da sequência consenso “natural” (Figura 3.3).

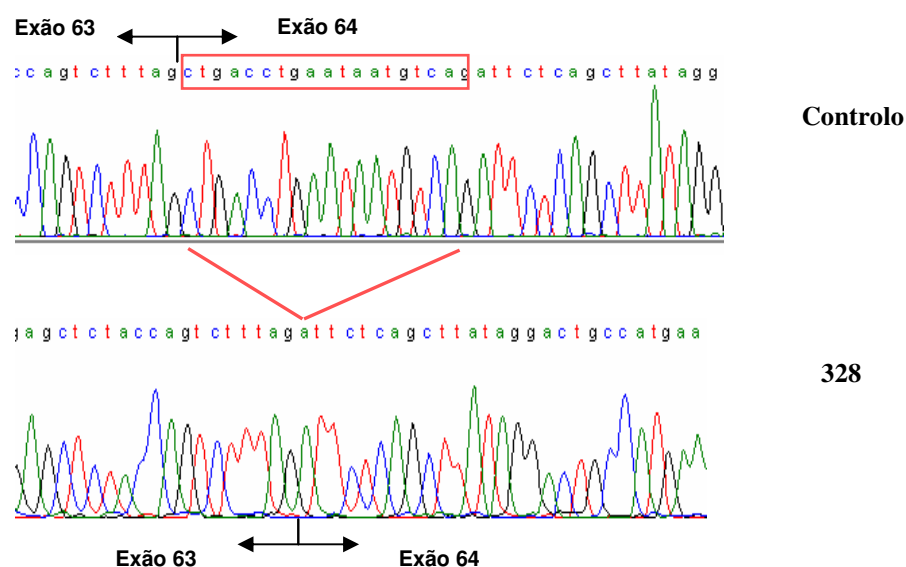


Figura 3.3 – Representação parcial da sequenciação do cDNA de uma amostra controlo e do caso 328. No caso 328, evidencia-se a mutação r.9287_9305del.

Esta deleção prevê-se criar um *frameshift* e originar uma proteína truncada (p.Ala3096AspfsX9).

3.1.2. Mutações de *splicing* que provocam o *skipping* de um ou vários exões

c.10086+2dupT (Caso 346)

No caso 346 foi detectada a alteração c.10086+2dupT no intrão 69. A previsão do software *Human Splicing Finder* indica uma redução de 20% no *score* deste local de *splicing*.

Foi possível estudar o mRNA, efectuando um RT-PCR da região alvo. O mesmo procedimento foi aplicado num controlo normal. A electroforese permitiu observar a ausência do fragmento de tamanho normal e a presença de outros fragmentos de tamanhos variáveis. Procedeu-se à sequenciação destes fragmentos, onde se verificou a presença de diferentes transcritos (Figura 3.4). Note-se, porém, que não se detectou a presença do transcrito normal.

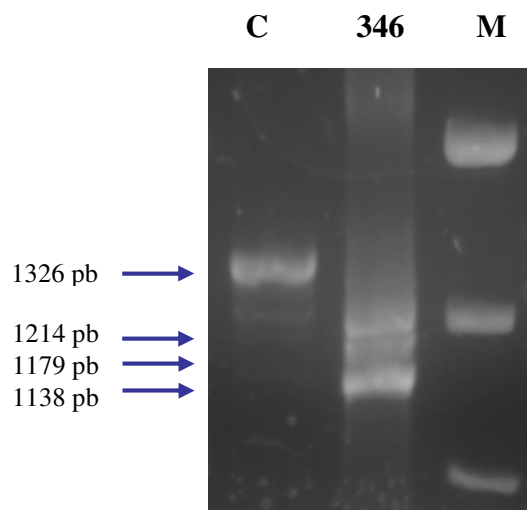


Figura 3.4 – Análise por RT-PCR dos transcritos presentes no músculo do caso 346 em gel agarose 2%/TAE (m/v). M- marcador; C-controlo. O fragmento de 1326 pb representa o transcrito normal, apenas detectado no controlo. Os fragmentos 1214, 1179 e 1138 representam o skipping dos exões 69, 68 e 69, 69 a 71, respectivamente.

A Figura 3.5 resume os diferentes transcritos detectados:

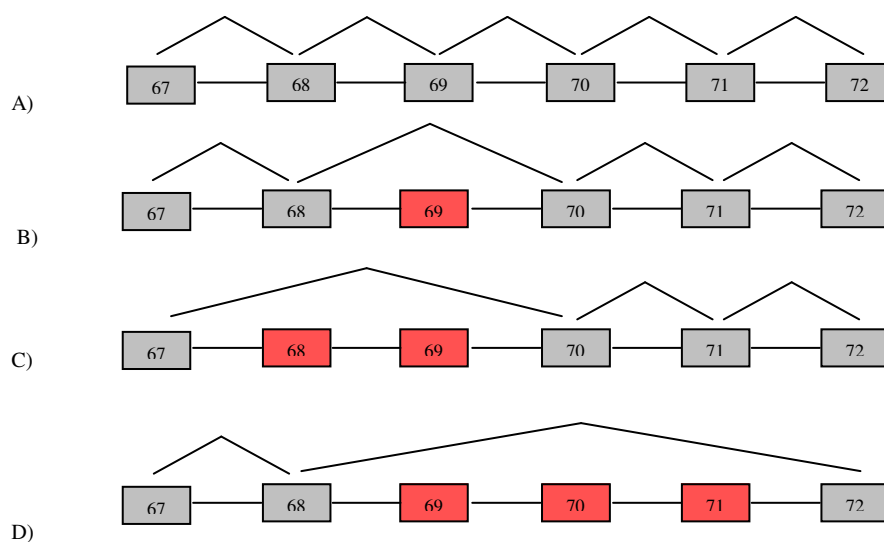


Figura 3.5 – Esquema representativo dos transcritos detectados no caso 346. A) Transcrito normal (não detectado no caso 346); B) *Skipping* do exão 69 – mutação *out-of-frame*; C) *Skipping* do exão 68 e exão 69 – mutação *in-frame*; D) *Skipping* do exão 69, exão 70 e exão 71 – mutação *in-frame*.

Foram detectados 3 transcritos alternativos. O primeiro transcrito é produto do *skipping* do exão 69, o que resulta numa alteração da grelha de leitura e, logo, numa proteína truncada

(p.Tyr3326LeufsX14). O segundo e terceiro transcrito, que incluem o *skipping* do exão 68 e 69 e do exão 69 a 71 respectivamente, não altera a grelha de leitura apesar de originar uma proteína com redução de aminoácidos. Estes dois últimos transcritos prevê-se resultar de *splicings* alternativos, de forma a restaurar a grelha de leitura e permitir a presença de alguma proteína funcional. *Splicings* alternativos dos exões 68 e 71 já tinham sido descritos previamente em promotores específicos do músculo esquelético (Feener *et al.*, 1989; Bies *et al.*, 1992b).

Note-se que os outros membros afectados da família também se revelaram portadores da mesma alteração (Figura 3.6)

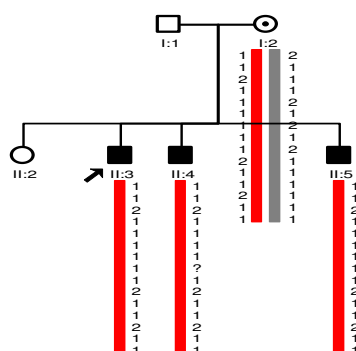


Figura 3.6 – Árvore da família 346 e respectiva haplotipagem (caso índice identificado com uma seta). Os elementos II-4 e II-5 também apresentaram a alteração c.10086+2dupT. Observou-se igualmente que o elemento I-2 era portador da mesma alteração.

c.9564-1G>A (caso 404)

Neste caso foi detectada a mutação de *splicing* c.9564-1G>A no intrão 65 (Figura 3.7).

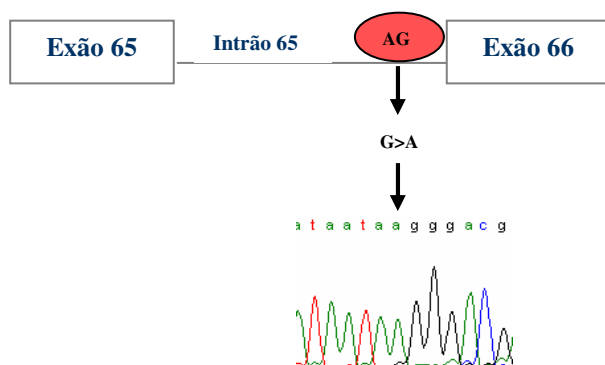


Figura 3.7 – Mutação c.9564-1G>A (caso 404). Figura representativa do local consenso de *splicing* afectado pela mutação c.9564-1G>A no intrão 65, juntamente com representação parcial da sequenciação do gDNA do caso 404.

A análise bioinformática realizada para a previsão do *score* associado ao local da mutação indicou uma diminuição do *score* de 82,53 para 53,59, resultando na perda do local aceitador de *splicing*.

Foi realizado o estudo do mRNA, procedendo à síntese do cDNA e amplificação da região alvo. A electroforese dos fragmentos obtidos pelo RT-PCR, demonstrou a presença de um fragmento de tamanho mais reduzido quando comparado com um controlo normal (Figura 3.8).

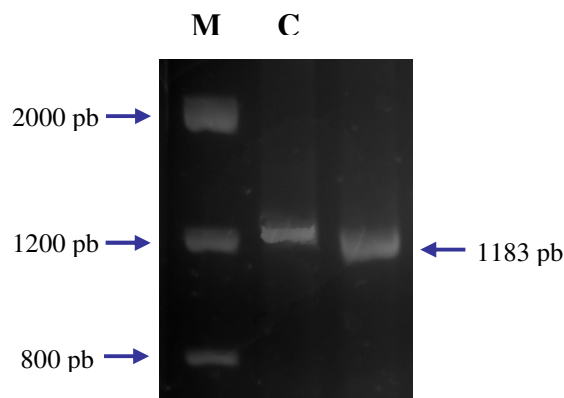


Figura 3.8 – Análise por RT-PCR do transcrito presente no músculo do caso 404, em gel agarose 2%/TAE(m/v). M- marcador; C-controlo.

A fim de esclarecer esta diferença, o fragmento em causa foi sequenciado e verificou-se a presença de um transcrito com o *skipping* do exão 66 (r.9564_9649del), como se observa na Figura 3.9. Trata-se de uma mutação *out-of-frame*, resultando, presumivelmente, numa proteína truncada (p.Gly3189ProfsX13).

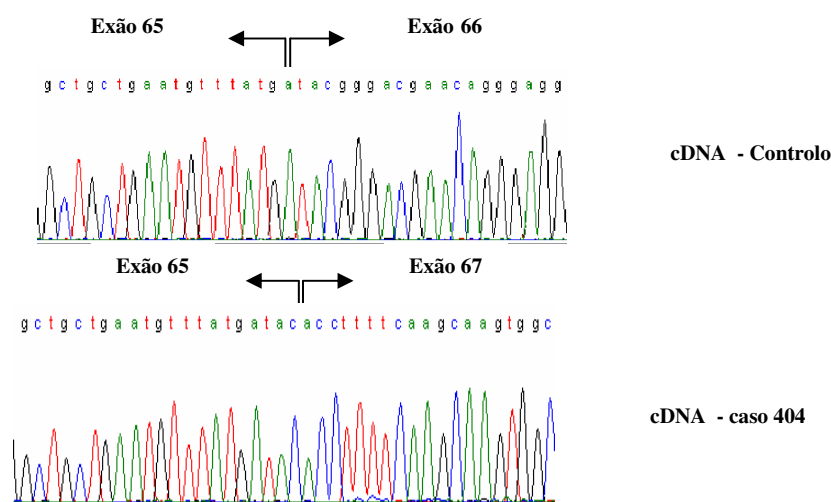


Figura 3.9 – Representação parcial da sequência do cDNA de uma amostra controlo e do caso 404. No caso 404, evidencia-se o *skipping* do exão 66 (r.9564_9649del).

c.9361+1G>A (caso 341)

A alteração c.9361+1G>A no intrão 64 (Figura 3.10), foi previamente descrita por Flanigan na BD Leiden (<http://www.dmd.nl>), sem indicação do seu efeito a nível do mRNA.

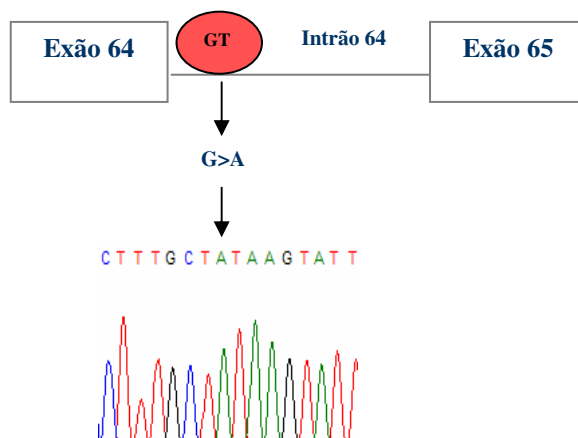


Figura 3.10 – Mutação c.9361+1G>A (caso 341). Figura representativa do local consenso de *splicing* afectado pela mutação c.9361+1G>A, no intrão 64, juntamente com representação parcial da sequenciação do gDNA do caso 341.

O presente estudo permitiu aprofundar o conhecimento acerca desta alteração, observando-se, por sequenciação do cDNA, a presença de dois transcritos: o transcrito normal e um transcrito que realiza o *skipping* do exão 64 (Figura 3.11).

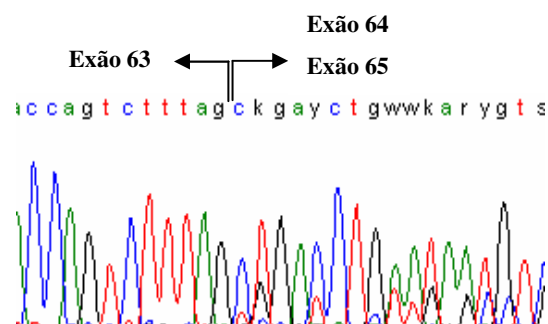


Figura 3.11 – Representação parcial da sequência do cDNA do caso 341. Evidencia-se a sobreposição das sequências do transcrito normal e do transcrito com *skipping* do exão 64 (r.[=,9287_9361del]).

Na análise bioinformática foi possível prever uma potencial perda do local de *splicing* na extremidade 5' do exão 64, com um *score* que varia de 82,62% na sequência de referência para 55,79% na sequência mutada.

A ausência do exão 64 origina uma mutação *in-frame*, prevendo assim a formação de um polipeptídeo mais encurtado (p.Ala3096_Leu3121delinsVal).

Este resultado prevê um fenótipo muito mais ligeiro que o observado no doente, que se revela bastante severo. No entanto, a literatura refere que deleções *in-frame* no domínio rico em cisteína (codificado pelos exões 63 a 70) invariavelmente causam DMD, o que pode explicar o fenótipo grave deste paciente. O facto de nunca terem sido descritas neste domínio deleções *in-frame* em doentes BMD indica que este domínio é indispensável à função da proteína, pois inclui o local de ligação ao β -dístroglicano e, consequentemente, ao DGC. A ruptura desta ligação destabiliza o sarcolema e torna as fibras musculares susceptíveis a necrose.

Para completar este estudo, seria necessário quantificar o transcrito normal *versus* o transcrito mutado, no entanto, dado a gravidade do fenótipo do paciente, pode-se especular que a expressão do transcrito mutado será substancialmente superior à do transcrito normal.

c.10223+1G>A (caso 368)

Existem várias referências na literatura da mutação c.10223+1G>A localizada no intrão 70 (Figura 3.12) (Lenk *et al.*, 1994, Roberts *et al.*, 1994; Nigro *et al.*, 1994), tendo o RNA sido estudado nos vários casos e onde foi detectada a alteração r.10087_10223del, que corresponde ao *skipping* do exão 70. A presença desta alteração a nível do cDNA, vai alterar a grelha de leitura e prevê-se originar um *frameshift* e, por consequência, uma proteína truncada (p.Thr 3363SerfsX24).

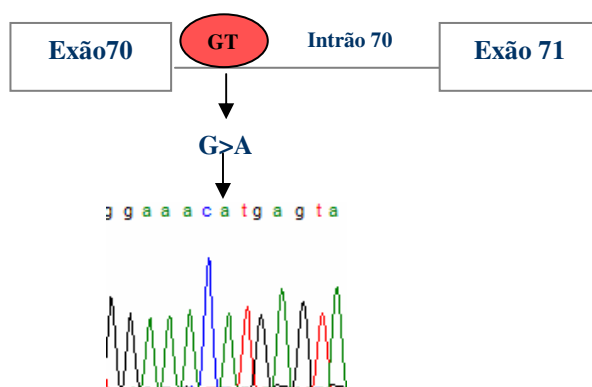


Figura 3.12 – Mutação c.10223+1G>A (caso 368). Figura representativa do local consenso de *splicing* afectado pela mutação c.10223+1G>A, no intrão 70, juntamente com representação parcial da sequenciação do gDNA do caso 368.

3.1.3. Mutações de *splicing* que envolvem retenção intrónica parcial

c.3603+3A>T (Caso 413)

A alteração c.3603+3A>T no intrão 26, que também já se encontra referenciada em BD Leiden (<http://www.dmd.nl>), não indicava de ter sido realizado o estudo do RNA mensageiro. No presente estudo, no entanto, foi possível observar o efeito desta alteração de *splicing*.

Procedeu-se a uma análise bioinformática a fim de averiguar qual o mecanismo de patogenicidade. O software *Human Splicing Analyser* prevê apenas uma redução de *score* de 84,55 (referência) para 79,52 (mutado) para este local de *splicing* (variação de 5,94%). Foi realizado um RT-PCR da região alvo, juntamente com um controlo, onde a electroforese permitiu observar a presença de um fragmento com tamanho semelhante ao controlo normal, de menor intensidade, e outro fragmento de tamanho superior e em maior proporção (Figura 3.13).

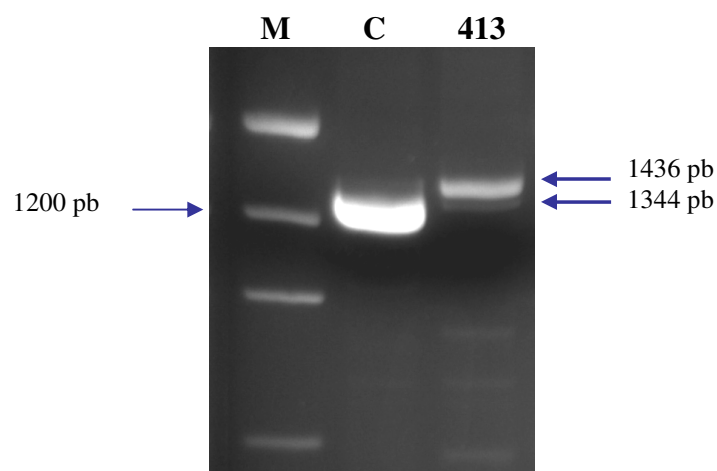


Figura 3.13 – Análise por RT-PCR dos transcritos presentes no músculo do caso 413, em gel agarose 2%/TAE (m/v). (M- marcador; C-controlo).

A sequenciação do fragmento revelou a presença do transcrito normal, juntamente com a presença de um transcrito que retém 116 nucleótidos do intrão 26, como exemplificado na figura 3.14.

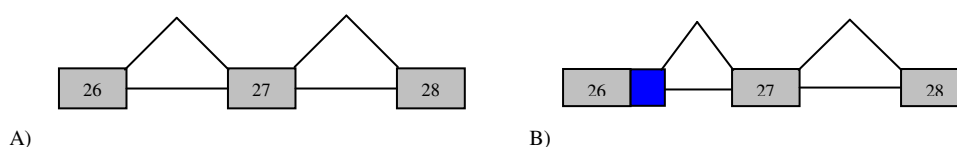


Figura 3.14 – Esquema representativo da retenção intrónica parcial no caso 413. A) Processo de *splicing* normal; B) Retenção intrónica parcial de 116 pares de bases observada no caso 413.

3.2. Mutações nonsense:

Foram detectadas 6 mutações *nonsense*, todas já descritas anteriormente na literatura, e que se encontram resumidas na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Descrição das mutações *nonsense* encontradas

Código Caso	Exão	Alterações gDNA	Efeito na proteína	Referência	Efeito no mRNA
133	41	c.5899C>T	(p.Arg1967X)	Saad <i>et al.</i> (1993)	r.5899c>u
217	70	c.10171C>T	(p.Arg3391X)	Barbieri <i>et al.</i> (1996)	---
299	32	c.4375C>T	(p.Arg1459X)	Prior <i>et al.</i> (1995)	---
370	55	c.8038C>T	(p.Arg2680X)	Tuffery-Giraud <i>et al.</i> (2004)	---
412	26	c.3469G>T	(p.Glu1157X)	Bullman <i>et al.</i> (1991)	r.3469g>u
415	70	c.10108C>T	(p.Arg3370X)	Roberts <i>et al.</i> (1992)	---

No caso 133 foi identificada a alteração c.5899C>T no exão 41 (p.Arg1967X), no caso 217 a alteração c.10171C>T no exão 70 (p.Arg3391X), no caso 299 a variação c.4375C>T no exão 32 (p.Arg1459X), no caso 370 a alteração c.8038C>T no exão 55 (p.Arg2680X), no caso 412 foi detectada a alteração c.3469G>T no exão 26 (p.Glu1157X) e, por fim, no caso 415 foi detectada a alteração c.10108C>T no exão 70 (p.Arg3370X).

Todas estas alterações localizam-se em locais de dinucleótidos CpG, regiões já reconhecidas como *hotspots* mutacionais (Buzin *et al.*, 2005).

Para além disso, todas estas alterações são concordantes com o fenótipo (DMD), com excepção do caso 133, em que o resultado da biópsia muscular é indicativo de Distrofia Muscular de Becker (BMD). Devido a esta discrepância genótipo/fenótipo, foi realizado o estudo do RNA mensageiro. Este estudo permitiu observar a presença de apenas um transcrito com a alteração já descrita (r.5899c>u).

3.3. Mutações de alteração da grelha de leitura (*frameshift*) - pequenas deleções ou pequenas inserções

A tabela 3.3 resume as mutações detectadas no decurso deste estudo correspondentes a pequenas deleções e pequenas inserções (sendo que uma mutação é simultaneamente deleção/inserção), que originam alteração da grelha de leitura e, logo, uma proteína truncada prematuramente.

Tabela 3.3 – Descrição das mutações de *frameshift* (pequenas deleções e pequenas inserções)

Código Caso	Exão	Alteração gDNA	Alteração proteína	Referência	Alteração mRNA
003	55	c.8098_8099delAA	p.(Lys2700ValfsX9)	Não descrita	r.8098_8099delaa
24	38	c.5328_5332delinsTCCTTTGAAGGC	p.(Ser1777ProfsX13)	Não descrita	---
231	13	c.1529_1530delTC	p.(Leu510HisfsX8)	Não descrita	---
274	56	c.8233delA	p.(Ile2745LeufsX19)	Não descrita	c.8233dela
301	55	c.8178delA	p.(Asp2727ThrX4)	Não descrita	---
371	75	c.10656delT	p.(Arg3554Glyfs40)	Não descrita	r.10656delu
379	49	c.7179_7180delAC	p.(Lys2393AsnfsX16)	Não descrita	r.7179_7180delac
442	18	c.2281_2285del	p.(Glu761SerX10)	Buzin <i>et al.</i> (2005)	---
445	74	c.10453dupC	p.(Leu3485ProfsX6)	BD Leiden	r.10453dupc

BD Leiden – Base de dados do locus *DMD* sediada em Leiden

3.3.1. Mutações *frameshift* não descritas na literatura

c.5328_5332delinsTCCTTTGAAGGC (caso 24)

No caso 24 observava-se uma história familiar de distrofia muscular ligada ao X concordante com a haplotipagem realizada para a distrofina nos seus familiares (Figura 3.15A).

Foi detectada uma nova variante no exão 38, c.5328_5332delinsTCCTTTGAAGGC (Figura 3.15B). Esta mutação complexa reflecte uma deleção de 5 nucleótidos e uma inserção de 11 nucleótidos, sendo que 9 nucleótidos (TCCTTTGAAG) aparentam ser uma duplicação de uma região quase adjacente ao local mutado.

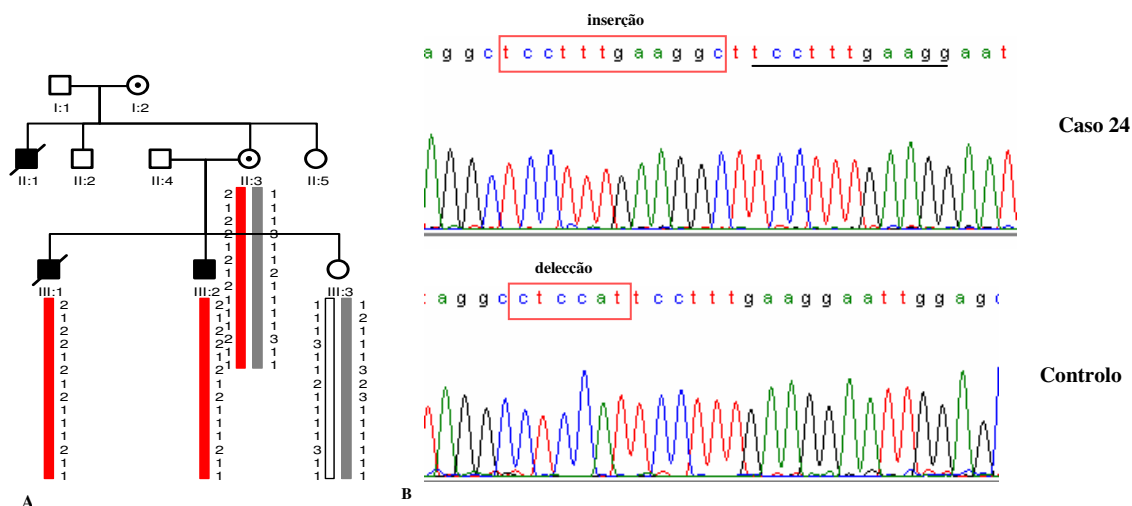


Figura 3.15 – A) Árvore da família do caso 24 (Elemento III-2) e respectiva haplotipagem. Verificou-se que o elemento II-1 e III-1 também apresentavam a mesma mutação que o caso índice, e que o elemento II-3 era portador da mutação c.5328_5332delinsTCCTTTGAAGGC.

B – Mutação c.5328_5332delinsTCCTTTGAAGGC (caso 24). Representação parcial da sequência do caso 24, onde se evidencia a mutação c.5328_5332delinsTCCTTTGAAGGC, comparada com um controlo normal.

Esta alteração altera a grelha de leitura da tradução da proteína, originando o aparecimento de um codão stop 13 aminoácidos a jusante da alteração (p.Ser1777ProfsX13).

c. 8098_8099delAA (Caso 003)

A sequenciação genómica do caso 003 permitiu a detecção de uma mutação nova no exão 55, que corresponde à deleção de duas bases: c.8098_8099delAA (Figura 3.16B). Prevê-se que esta mutação altere a grelha de leitura, originando o aparecimento de um codão stop prematuro 9 aminoácidos após a mutação (p.Lys2700ValfsX9). Dado o facto de ser uma mutação ainda não descrita, procurou-se averiguar o seu efeito a nível do mRNA, tendo sido detectado apenas um transcrito com a alteração verificada no gDNA (r.8098_8099delaa).

A análise do gDNA da família permitiu confirmar a presença da deleção em vários elementos (Figura 3.16A).

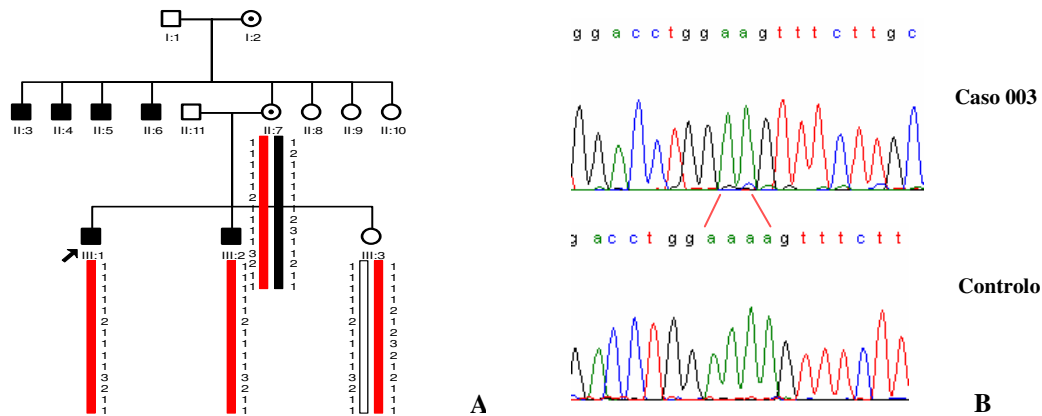


Figura 3.16 – A) Árvore da família 003 e respectiva haplotipagem (caso índice identificado com uma seta). Verificou-se que o elemento III-2 apresentava a mesma mutação que o caso índice, e que os elementos II-7 e III-3 eram portadores da mutação c.8098_8099delAA. **B) Mutação c.8098_8099delAA (caso 003).** Representação parcial da sequência do caso 003, onde se evidencia a mutação c.8098_8099delAA, comparada com um controlo.

c.1529_1530delTC (Caso 231)

No caso 231 foi detectada a contracção do dinucleótido TC no exão 13, como evidencia a figura 3.17. Esta alteração prevê-se originar uma alteração da grelha de leitura e o aparecimento de um codão de terminação prematuramente (p.Leu510HisfsX8).

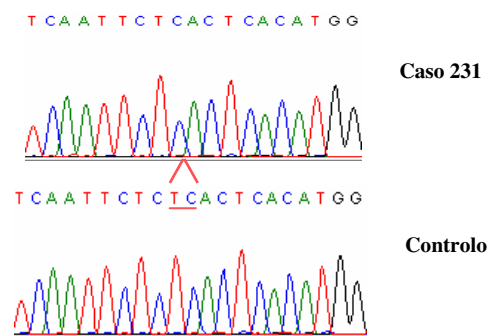


Figura 3.17 – Mutação c.1529_1530delTC (caso 231). Representação parcial da sequência do caso 231, onde se evidencia a mutação c.1529_1530delTC, comparada com um controlo normal.

c.8233delA (Caso 274)

O caso 274 apresentava uma história familiar de distrofia muscular ligada ao X, como permitiu verificar a análise haplotípica realizada a vários elementos da família (Figura

3.18). Foi detectada uma nova variante no exão 56, c.8233delA, que se verificou também estar presente em todos os outros elementos da família presumivelmente afectados ou portadores de distrofinopatia (Figura 3.18 e 3.19)

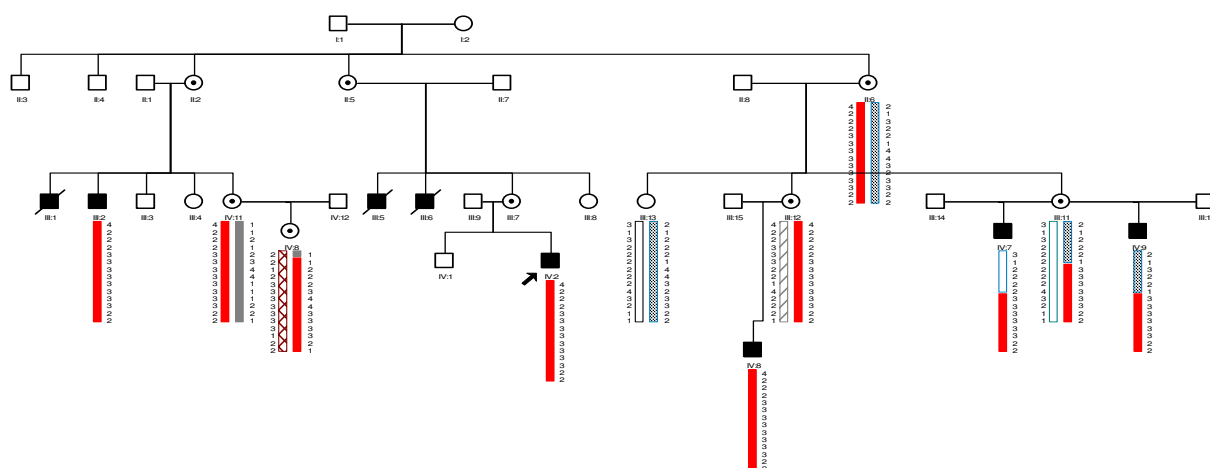


Figura 3.18 – Árvore e análise haplotípica a elementos da família do caso 274. O caso 274 encontra-se representado com uma seta. O haplótipo marcado a vermelho indica o haplótipo de risco associado à patologia.

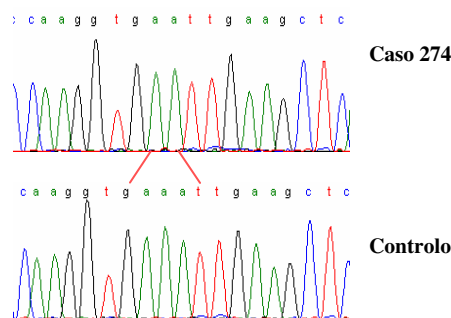


Figura 3.19 – Mutação c.8233delA (caso 274). Representação parcial da sequência do caso 274, onde se evidencia a mutação c.8233delA, comparada com um controlo normal.

Esta família apresenta uma grande variabilidade fenotípica, abrangendo casos de BMD típico, BMD grave, e DMD. No entanto, apenas houve disponibilidade de estudar o mRNA de um elemento com apresentação fenotípica mais grave. Neste caso, apenas foi detectado um transcrito com a alteração encontrada no gDNA (r.8233delA).

c.8178delA (caso 301)

No caso 301, foi possível identificar uma deleção de uma adenina no exão 55 (c.8178delA), que causa um *frameshift*, o aparecimento de um codão de terminação prematuro e, previsivelmente, uma proteína truncada (p.Asp2727ThrfsX5) (figura 3.20). O seu irmão afectado apresentou a mesma alteração.

Neste caso não foi possível estudar o mRNA por indisponibilidade de amostra de biópsia muscular.

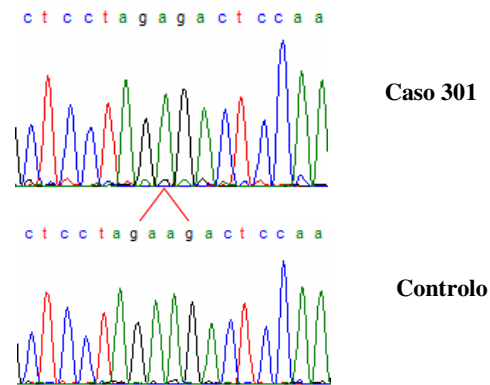


Figura 3.20 – Mutação c.8098_8099delAA (caso 301). Representação parcial da sequência do caso 003, onde se evidencia a mutação c.8098_8099delAA, comparada com um controlo normal.

c.10656delT (caso 371)

Identificou-se a alteração c.10656delT no exão 75 a nível genómico, que foi igualmente confirmada a nível do cDNA. Esta mutação altera a grelha de leitura e origina uma proteína truncada (p.Arg3554GlyfsX40) (Figura 3.21). Esta alteração foi confirmada a nível do cDNA (r.10656delu).

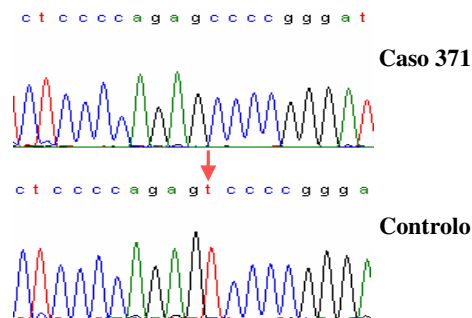


Figura 3.21 – Mutação c.10656delT (caso 371). Representação parcial da sequência do caso 371, onde se evidencia a mutação c.10656delT, comparada com um controlo normal.

c.7179_7180delAC (Caso 379)

Neste caso foi efectuado o mesmo procedimento que no caso anterior, onde se detectou a alteração c.7179_7180delAC no exão 49 (p.Lys2393AsnfsX16), como demonstra a Figura 3.22, e que também foi confirmada a nível do cDNA (r.7179_7180delac).

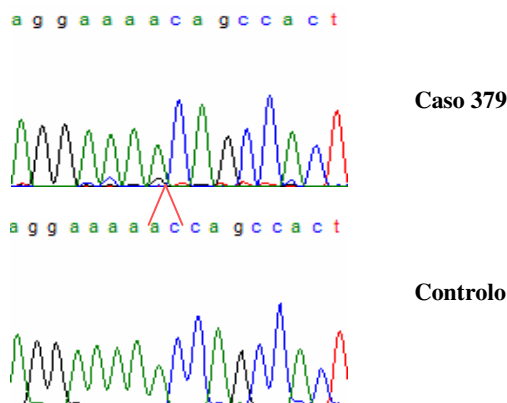


Figura 3.22 – Mutação c.7179_7180delAC (caso 379). Representação parcial da sequência do caso 379, onde se evidencia a mutação c.7179_7180delAC, comparada com um controlo normal.

3.3.2. Mutações *frameshift* descritas na literatura

Foram detectadas 2 mutações correspondentes a uma deleção e a uma duplicação, anteriormente descritas, nomeadamente a mutação c.2281_2285del (exão 18) no caso 442 e a mutação c.10453dupC (exão 74) no caso 445.

O caso 445 apresentava um resultado imunohistoquímico sugestivo de BMD, pelo que neste caso efectuou-se o estudo do mRNA. Este estudo permitiu observar a presença de apenas um transcrito com a alteração descrita (r. 10453dupc).

3.4. Delecccão de codão

c.10097_10099delGAG (Caso 311)

No caso 311 foi detectada uma nova alteração, que compreende a delecccão de 3 bases, GAG, no exão 70 (c.10097_10099delGAG), e que origina a delecccão de um codão (p.Gly3366del) (Figura 3.23).

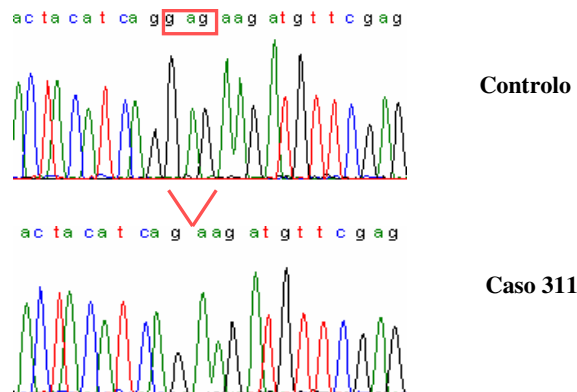


Figura 3.23 – Mutação c.10097_10099delGAG (caso 311). Representação parcial da sequência do caso 311, onde se evidencia a mutação c.10097_10099delGAG, comparada com um controlo normal.

Este tipo de mutações é um evento extremamente raro no gene da distrofina. No entanto, a variação apresentada representa a 5ª alteração do tipo num intervalo de 33 aminoácidos, a resultar num fenótipo DMD (Lenk *et al.*, 1996, Goldberg *et al.*, 1998, Becker *et al.*, 2001; Derbugrave *et al.*, 2007).

Para além disso, a literatura revela que todas as mutações resultantes na perda parcial ou total do domínio cisteínico (aminoácidos 3056 a 3408) têm consequências graves a nível fenotípico.

A avaliação do impacto da delecccão deste aminoácido foi efectuada recorrendo a métodos bioinformáticos.

A informação obtida no alinhamento de sequências homólogas em espécies diferentes há muito que é reconhecida como um factor importante para compreender a variação genética em humanos (Miller & Kumar, 2001). Num determinado conjunto de sequências, uma fracção de aminoácidos será conservada mesmo entre espécies distantes que divergiram há milhões de anos. Ao longo da evolução, as variações que aparecem nessas posições

conservadas estiveram sob uma selecção muito forte o que sugere que esses resíduos aminoacídicos são críticos para a função da proteína. Assim, a informação resultante dos alinhamentos interespecíficos pode dar uma indicação de quais os aminoácidos da proteína que são prováveis de provocar doença se estiverem mutados nos humanos.

Foi efectuada uma comparação da sequência da proteína distrofina humana com sequências de outros organismos, recorrendo ao software ClustalX. O alinhamento das sequências homólogas revelou que o resíduo aminoacídico delectado no caso 311 é bastante conservado nas espécies analisadas (Figura 3.24).

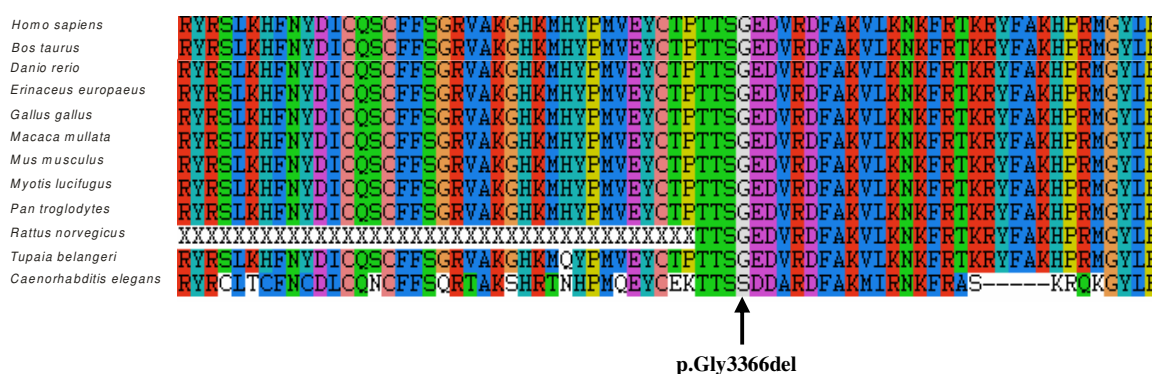


Figura 3.24 – Representação parcial do alinhamento da distrofina humana com distrofinas de outras espécies, evidenciando a conservação do aminoácido 3366.

Este resíduo encontra-se localizado na região seguinte ao domínio ZZ (proposto ligar o Zn^{2+} e mediar a interacção ao β -dystroglicano), e que apesar de até à data não ter sido descrita uma função para esta região, trata-se de uma das mais conservadas na proteína distrofina (Roberts, 1998).

O estudo do mRNA revelou a presença de um transcrito, onde foi igualmente possível detectar a deleção das 3 bases GAG do exão 70. No entanto, o mesmo transcrito apresentava o *skipping* do exão 71 (mutação in-frame).

Uma das explicações possíveis para este facto poderá ser um *splicing* alternativo do exão 71 (Feener *et al.*, 1989; Bies *et al.*, 1992b).

A outra hipótese refere-se à possibilidade da região onde se encontra a alteração constituir uma sequência ESE (*Exonic Splicing Enhancer*), motivo importante no processo de

splicing para o reconhecimento do exão. Uma mutação numa ESE faria com que a maquinaria de *splicing* omiti-se o exão 70, o que resultaria numa mutação *out-of-frame*.

Por sua vez, a deleção do exão 70, em combinação com o *splicing* alternativo do exão 71, anteriormente descrito por Feener (1989), Bies (1992b) e seus colaboradores, resultaria igualmente numa mutação *out-frame*. A presença destas mutações origina portanto transcritos aberrantes e uma provável activação do mecanismo NMD (*non-mediated mRNA decay*), motivo pelo qual poderá não se ter detectado estes transcritos.

O transcrito que foi detectado foi o único que não sofreu acção do mecanismo NMD, por representar uma mutação *in-frame*.

A análise bio-informática da região mutada não permite esclarecer este facto na medida em que tanto prevê a perda de ligação da proteína SF2/ASF, como prevê a criação de um novo local de ligação para esta mesma proteína e para a proteína SRp40, componentes fundamentais para a ocorrência do *splicing*.

Para tentar excluir um eventual polimorfismo, foi realizado um rastreio populacional em 240 controlos do sexo masculino (240 alelos) por análise de fragmentos, não tendo sido detectada a nova variante em nenhum dos controlos.

Foi possível realizar a análise de segregação na mãe e tia do doente. Ambas eram portadoras do mesmo haplótipo de risco, no entanto, apenas a mãe do doente era portadora da variante (c.10097_10099del). Note-se que, tanto por sequenciação como por análise de fragmentos, se verificou na mãe do caso índice uma prevalência do alelo normal em comparação com o alelo mutado (Figura 3.25). Este facto pode sugerir a ocorrência de mosaicismo (a nível somático) na mãe e a indicação de uma provável ocorrência de uma mutação *de novo* na mãe na sua fase embrionária inicial.

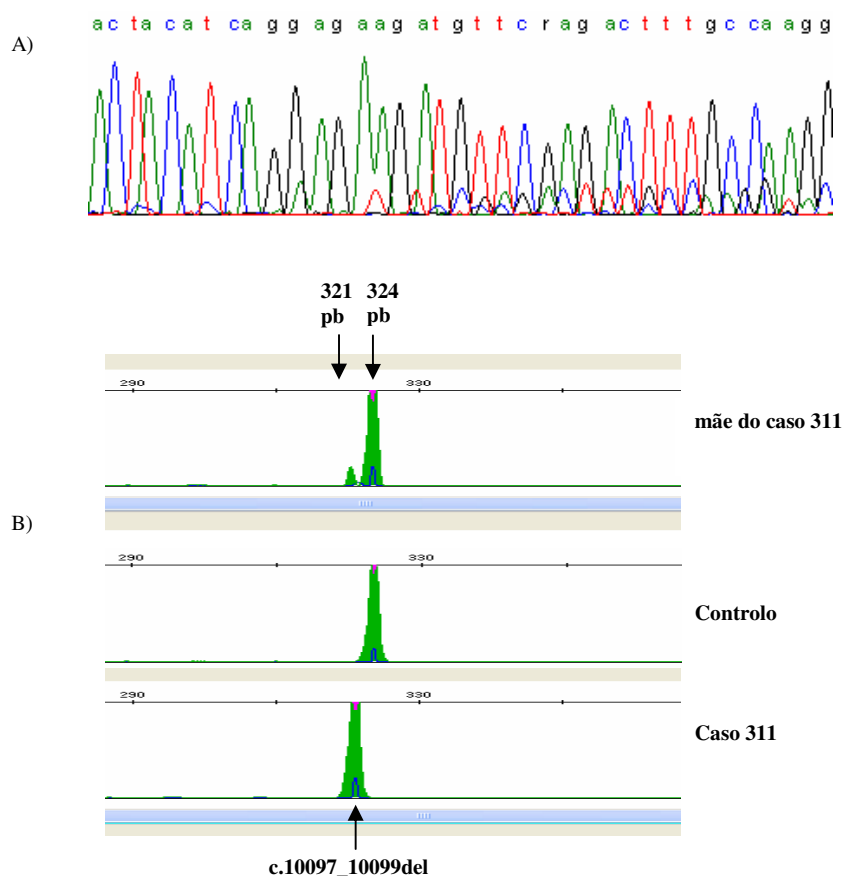


Figura 3.25 – Mutação c.10097_10099del (caso 311). A) Representação parcial da sequência da mãe do caso 311, onde se evidencia a mutação c.10097_10099del, em heterozigotia. B) Resultado exemplificativo do rastreio populacional realizado para a variação c.10097_10099del do exão 70, por análise de fragmentos. No caso 311 verifica-se a presença de um fragmento 3 pares de base menor que o controlo normal, enquanto que a mãe é heterozigota para a variação, apresentando um alelo de tamanho normal e um alelo de tamanho igual ao 311, apesar de menor intensidade do pico.

Todos estes dados, a conservação do aminoácido ao longo da evolução, a provável ocorrência de uma mutação *de novo* e a importância do domínio Cisteínico para a funcionalidade da proteína, enfatiza a hipótese do efeito patogénico desta mutação.

3.5. Casos negativos

Nos casos 309, 333 e 421 não foram detectadas quaisquer variações de sequência consideradas patogénicas. Existem mutações causadoras de distrofinopatias não detectáveis pelo método de sequenciação genómica utilizado neste trabalho. Estas alterações podem corresponder a substituições de uma única base, localizadas a grande distância dos locais consenso de *splicing*, nos grandes intrões do gene (*deep intronic mutations*) e que causam a activação de locais crípticos e a incorporação de sequências intrónicas no mRNA. Um método ideal para as detectar seria a sequenciação sistemática do RNA mensageiro obtido a partir de biópsia muscular. No entanto, e para os casos 309 e 333 não foi possível dispor das suas biópsias musculares. Da mesma forma, e pelo facto de não terem sido sequenciadas as regiões reguladoras do gene, não podemos excluir a presença de mutações nestas regiões não codificantes.

Deve-se ainda ter em conta a heterogenicidade das distrofias musculares, que por vezes apresentam um fenótipo semelhante, o que torna difícil distingui-las. Nestes casos uma a presença de uma história familiar de distrofia muscular ligada ao X e o resultado da imunohistoquímica pode ajudar a esclarecer a sua etiologia.

Nos casos 421 e 333, sem registo de história familiar, o resultado da biópsia muscular indica uma redução e irregularidade da marcação dos anticorpos da distrofina, acompanhada de uma redução em alguns anticorpos das proteínas do complexo dos sarcoglicanos. É sabido que ambas as proteínas podem estar reduzidas tanto na existência de uma distrofinopatia como de uma sarcoglicanopatia, pelo que deve ser ponderada uma revisão destes casos. Sugere-se um estudo da expressão de proteínas por Western Blot e um eventual rastreio dos genes envolvidos nas sarcoglicanopatias. Poder-se-à igualmente estudar o mRNA da distrofina por RT-PCR, a fim de detectar as mutações muito intrónicas. Da mesma forma, não se poderá excluir a existência de mutações em outros genes envolvidos noutras formas de distrofias musculares progressivas.

3.6. Correlação fenótipo/genótipo

A grande maioria dos casos seleccionados para este estudo eram fenotipicamente DMD, o que vai de encontro à maior incidência da DMD relativamente à BMD, e à dificuldade de por vezes distinguir a BMD de outras distrofias musculares progressivas com uma apresentação clínica semelhante.

As mutações identificadas encontravam-se predominantemente localizadas na região distal do gene. Poderíamos estabelecer uma correlação entre a localização das mutações na região mais distal do gene e o fenótipo DMD, no entanto, é necessário ter em consideração o número limitado de doentes estudados, a selecção criteriosa dos doentes, e a baixa prevalência de casos BMD.

As mutações *nonsense* e de *frameshift* presumivelmente originam proteínas truncadas. Regra geral, todos os transcritos em que a tradução termina antes do ribossoma atingir a posição do evento de *splicing* mais a 3' são marcados e destruídos via *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) (Frischmeyer, 1999).

Na maioria das situações, o NMD é vantajoso, protegendo as células de efeitos potencialmente prejudiciais de proteínas truncadas, em particular quando estas têm um efeito dominante negativo.

À semelhança da maioria dos genes, é provável que o transcrito da distrofina também esteja sujeito a este mecanismo de vigilância. Aliás, verifica-se que os níveis de proteína nas fibras musculares de doentes com DMD é extremamente baixo ou nulo (Chelly *et al.*, 1990).

Existem, no entanto, casos descritos de doentes BMD com mutações *nonsense* sendo que, nestes casos, o estudo do mRNA é um passo essencial (Shiga *et al.*, 1997; Ginjaar *et al.*, 2000; Fajkusová *et al.*, 2001; Disset *et al.*, 2006; Derbugrave *et al.*, 2007).

Neste estudo, foram detectadas duas mutações *nonsense* e *frameshift*, correspondentes aos casos 133 e 445 respectivamente, onde o estudo imunohistoquímico indicou um provável diagnóstico de BMD. Por este facto, procurou-se estudar o mRNA a fim de verificar se não estariam a ocorrer fenómenos de *skipping* do exão mutado originados pela presença das mutações em locais ESE. Este estudo revelou-se negativo, pois só foi detectado o transcrito com a mutação. Pelo facto da idade de diagnóstico da distrofia muscular ter sido bastante

precoce em ambos os casos, poderá ainda tratar-se de casos DMD ou intermediários, em que o acompanhamento da evolução da doença nestes pacientes irá provavelmente clarificar o fenótipo.

No que diz respeito ao caso 445, no entanto, que apresenta uma mutação que altera a grelha de leitura no exão 74, existe outra explicação possível para a presença de um fenótipo BMD.

Estudos anteriores demonstram que mutações *frameshift* localizadas na região C-Terminal da distrofina (onde se inclui o exão 74), podem ter consequências fenotípicas distintas (McCabe *et al.*, 1989; Gardner *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1992).

Kerr *et al.* (2001) sugere que, uma vez excluída a presença de *splicings* alternativos no exão mutado, a explicação poderá residir numa baixa eficiência do mecanismo de NMD.

O estudo imunohistoquímico do caso 445 evidencia alguma marcação positiva com os anticorpos da distrofina, sugerindo que alguma proteína, apesar de menos funcional, terá sido produzida.

Para além disso, estudos efectuados em ratinhos transgénicos concluíram que a região C-terminal é relativamente dispensável para a função muscular (Raphael *et al.*, 1996; Crawford *et al.*, 2000), pelo que a síntese de uma proteína truncada nesta região terminal, não destruída eficazmente via NMD, teria um efeito fenotípico mais ligeiro.

Outro facto interessante diz respeito a descrições de variações fenotípicas entre familiares que apresentam o mesmo genótipo (Ginjaar *et al.*, 2000). Foi comprovado que diferentes elementos afectados de uma família, devido a uma mutação que afecta uma ESE, podem ter diferentes níveis de *splicing* alternativo do exão mutado *in-frame*, provavelmente devido a variação inter-individual em factores de regulação envolvidos nestes processos.

Na família do caso 274, que apresenta essa variabilidade fenotípica, o *skipping* do exão 56 (onde se detectou a mutação), representaria uma mutação *out-frame*. Por sua vez, o estudo do RNA mensageiro apenas foi possível em dois elementos da família com apresentação fenotípica mais grave, onde foi detectado apenas um transcrito com a alteração descrita (r.8233del).

A presença/ausência de marcação dos anticorpos do estudo imunohistoquímico efectuado na biópsia muscular pode igualmente permitir algumas correlações genótipo/fenótipo. No caso 412, a marcação para o anticorpo DYS2 (aminoácidos 3668-3684) em algumas fibras, não é muito concordante com a caracterização molecular deste paciente, na medida em que este anticorpo reconhece como epítopo uma região localizada a jusante do seu codão stop prematuro, no aminoácido 1157. Tal facto, provavelmente deve-se à presença de fibras revertidas com marcação de distrofina positiva, fenómeno já anteriormente identificado em vários doentes DMD, e que surge como resultado de processos de *splicing* alternativo. Note-se que a análise do mRNA só revelou a presença de um transcrito com a mutação identificada no gDNA.

Os casos 217, 346, 368 e 404, para além de uma sintomatologia característica de distrofia muscular, possuíam um atraso de desenvolvimento cognitivo, que também está associado às distrofinopatias. Os transcritos *out-of-frame* observados nestes casos levam à terminação prematura da tradução na sequência codificante do Dp71. Mutações na parte distal do gene provavelmente resultam na perda de todas as isoformas produzidas no cérebro, o que pode explicar o porquê destes pacientes apresentarem um fenótipo cognitivo grave.

3.7. Implicações do processo de *splicing*

Apesar de muitas alterações de *splicing* serem detectáveis por sequenciação do DNA genómico em torno das regiões de consenso, é muito difícil prever o seu impacto a nível do mRNA. Neste estudo foram detectadas 6 mutações de *splicing*, sendo que 2 mutações estavam localizadas em locais de *splicing* dadores a 5', e 4 mutações em locais de *splicing* aceitadores a 3'.

Neste estudo verificou-se como o processo de *splicing* depende não só das sequências consenso flaqueadoras da junção intrão-exão, geralmente AG-GT (Burset *et al.*, 2000), mas também das regiões adjacentes, como se revelou ser o caso das mutações c.3603+3A>T e c.10086+2dupT.

Para além disso, permitiu observar diferentes consequências de mutações em locais de *splicing*, pois não só originam o *skipping* do exão, como podem também levar à utilização de um novo local críptico de *splicing*, localizado quer a nível exónico (como se verificou no caso 328), quer a nível intrónico (caso 413) (Baralle & Baralle, 2005).

Estudos sugerem que a decisão entre estas diferentes consequências está dependente de vários factores, que incluem o tamanho do exão e do intrão, a estrutura secundária do pré-mRNA, a conservação do quadro de leitura, e o contexto local da sequência de DNA/RNA das junções exão-intrão que foi afectada (Roca *et al.*, 2005; Miriami *et al.*, 2004; Buratti & Baralle, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Krawczack *et al.* (1992) demonstraram igualmente que a escolha entre *skipping* do exão/novo local críptico de *splicing* é provavelmente determinado pela abundância relativa de motivos de *splicing* alternativos na região do local de *splicing* mutado.

Para além dos sinais de *splicing* clássicos, as sequências flanqueadoras e *branch-site* YNYURAY (15-35 bases a montante do local de *splicing* a 3'), existem também outros elementos *cis* auxiliares que estão envolvidos no reconhecimento dos locais de *splicing*, os ESE/ISE (*exonic/intronic splicing enhancers*) e os ESS/ISS (*exonic/intronic splicing silencers*). Estas sequências têm sido identificadas como potenciadoras ou repressoras do uso de locais de *splicing* dadores ou aceitadores, pelo que diferentes tipos de mutações nestes locais podem afectar o *splicing* (Cartegni *et al.*, 2002; Pagani & Baralle, 2004).

Este estudo permitiu identificar um potencial ESE, no caso 311, referente à mutação c.10097_10099del.

A análise informática permite avaliar o *score* de um local de *splicing* dador ou aceitador, mas não permite prever a importância relativa do fenómeno de *skipping* do exão versus a activação de um local críptico. Nestes casos, o estudo do mRNA revelou-se um passo fundamental na clarificação destes mecanismos.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

4. CONCLUSÃO

A análise mutacional do gene da distrofina é relativamente fácil devido à elevada proporção de grandes deleções, e pode ser rapidamente detectável por técnicas como PCR Multiplex, *Southern Blot* ou MLPA (que permite igualmente a detecção de duplicações).

A análise das restantes, as mutações pontuais, que representam quase um terço das mutações, é um grande desafio, devido à heterogeneidade e ao tamanho do gene *DMD*. Por este facto, esta nova abordagem ao diagnóstico das distrofinopatias deverá ser essencialmente adoptada, não como método de rotina para todos os casos com suspeita de DMD/BMD, mas como estudo complementar às técnicas de rotina laboratoriais, em caso de resultado molecular negativo para grandes deleções e duplicações. Pelo mesmo facto, e dado que a apresentação dos sintomas das distrofias musculares por vezes se sobrepõem, será importante uma caracterização clínica e imunohistoquímica detalhada dos casos candidatos a este tipo de abordagem.

70% dos doentes recolhidos para este estudo eram casos esporádicos, o que torna o aconselhamento genético muito difícil sem o conhecimento da mutação. Esta caracterização molecular torna possível testar o DNA genómico dos familiares do sexo feminino de forma a confirmar ou excluir o estatuto de portadoras e assim fornecer um aconselhamento genético e um diagnóstico pré-natal mais adequado.

Para além disso, a informação acerca da origem parental das novas mutações é importante para calcular o risco de recorrência em famílias com DMD esporádico. Estudos anteriores demonstraram que nas doenças ligadas ao X, as deleções ocorrem predominantemente nas células germinativas femininas, enquanto que mutações pontuais e duplicações ocorrem predominantemente nas células germinativas masculinas. Isto também é complicado pelo elevado nível de mosaicismo das linhas germinativas.

Todas as mutações *nonsense* detectadas ocorrem em sítios CpG, que são *hot-spots* mutacionais já conhecidos, e por isso todos já tinham sido previamente descritos na base de dados do locus *DMD* sediada em Leiden (<http://www.dmd.nl>).

50% das mutações pontuais não estavam ainda descritas, sendo na sua maioria mutações *frameshift* de pequenas deleções ou pequenas duplicações e mutações em locais de *splicing*.

Para doentes candidatos a terapia génica, um domínio de investigação que se encontra em crescente expansão na área das distrofinopatias e com resultados in-vitro e clínicos promissores, a caracterização molecular é fundamental já que a terapia é direccionada não só ao tipo, mas ao local específico da mutação.

Por outro lado, a contribuição da caracterização molecular aprofundada dos doentes, especialmente a nível dos mecanismos de *splicing*, fornece indicações úteis para a investigação e desenvolvimento das próprias terapias.

A aplicabilidade da implementação desta metodologia, que permite a sequenciação genómica de todas as regiões exónicas e junções intrónicas e a sequenciação da totalidade do cDNA, ultrapassa o simples rastreio sistemático de todo o gene. Esta metodologia poderá igualmente auxiliar numa melhor caracterização molecular dos casos positivos detectados pelas técnicas de rotina. Nomeadamente, o estudo do mRNA por sequenciação poderá ser uma ferramenta importante na definição dos pontos de quebra e junção das deleções e duplicações exónicas previamente identificadas. Por outro lado, a amplificação de todos os exões do gDNA poderá ser importante no esclarecimento de mutações que evidenciem a ausência de apenas um único exão por MLPA, o qual poderá reflectir uma deleção de facto do exão ou apenas uma mutação pontual ou polimorfismo no local de ligação da sonda de MLPA.

Resumidamente, podemos concluir que este estudo permitiu a identificação de mutações pontuais causais em doentes com DMD/BMD; implementar uma abordagem molecular complementar ao diagnóstico molecular de rotina para estas patologias; discutir o impacto das mutações a nível do mRNA e na estrutura e função da proteína; estabelecer uma correlação entre as alterações encontradas e os fenótipos clínicos; e observar os diferentes efeitos de mutações em locais de *splicing*.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho revela-se apenas o primeiro passo para a caracterização das mutações pontuais em doentes com distrofinopatias.

A elevada positividade detectada no presente estudo justifica a implementação desta abordagem molecular por sequenciação pelo que é fundamental alargar este estudo a outros doentes com suspeita de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker.

Será importante realizar estudos de quantificação dos níveis de mRNA destes pacientes por Real Time PCR, fundamental para a aplicabilidade das terapias moleculares personalizadas. Por outro lado, seria interessante investir no desenvolvimento de microarrays de cDNA, e de expressão de outros genes que possam estar envolvidos nas distrofinopatias, e avaliar o impacto das mutações encontradas a nível da proteína através de técnicas de imunoblot.

Pretende-se igualmente alargar o estudo do mRNA a casos já caracterizados molecularmente para grandes deleções e duplicações, de forma a permitir uma melhor definição dos pontos de quebra e junção e uma melhor explicação de possíveis discrepâncias genótipo/fenótipo. Tal será igualmente útil para a selecção de uma terapêutica direccionada e personalizada.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Baas F et al. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003; **12**(8):907-14.

Aartsma-Rus A, Janson AA, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 2007; **8**:43.

Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006; **34**(2):135-44.

Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* 2007; **13**(10):1609-24.

Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, Bentley DR, Bobrow M. Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 1990; **7**(4):602-6.

Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 1993; **3**(4):283-91.

Amann KJ, Renley BA, Ervasti JM. A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J Biol Chem* 1998; **273**:28419-28423.

Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW. Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* 1996; **271**(12):6605-10.

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, et al. Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem* 2003; **134**(5):751-8.

Arikawa-Hirasawa E, Koga R, Tsukahara T, Nonaka I, Mitsudome A, Goto K, et al. A severe muscular dystrophy patient with an internally deleted very short (110 kD) dystrophin: presence of the binding site for dystrophin-associated glycoprotein (DAG) may not be enough for physiological function of dystrophin. *Neuromuscul Disord* 1995; **5**(5):429-38.

Ashton EJ, Yau SC, Deans ZC, Abbs SJ. Simultaneous mutation scanning for gross deletions, duplications and point mutations in the DMD gene. *Eur J Hum Genet* 2008; **16**(1):53-61.

Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet* 1995; **4**(9):1475-83.

Austin RC, Morris GE, Howard PL, Klamut HJ, Ray PN. Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord* 2000; **10**(3):187-93.

Bakker E, Van Broeckhoven C, Bonten EJ, van de Vooren MJ, Veenema H, Van Hul W, et al. Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations. *Nature* 1987; **329**(6139):554-6.

Bakker E, Veenema H, Den Dunnen JT, van Broeckhoven C, Grootsholten PM, Bonten EJ, et al. Germinal mosaicism increases the recurrence risk for 'new' Duchenne muscular dystrophy mutations. *J Med Genet* 1989; **26**(9):553-9.

Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet* 2005; **42**(10):737-48.

Barbieri AM, Soriani N, Ferlini A, Michelato A, Ferrari M, Carrera P. Seven novel additional small mutations and a new alternative splicing in the human dystrophin gene detected by heteroduplex analysis and restricted RT-PCR heteroduplex analysis of illegitimate transcripts. *Eur J Hum Genet* 1996; **4**(3):183-7.

Bardoni A, Sironi M, Felisari G, Comi GP, Bresolin N. Absence of brain Dp140 isoform and cognitive impairment in Becker muscular dystrophy. *Lancet* 1999; **353**(9156):897-8.

Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999; **104**(4):375-81.

Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 1989; **39**(4):465-74.

Becker K, Robb SA, Hatton Z, Yau SC, Abbs S, Roberts RG. Loss of a single amino acid from dystrophin resulting in Duchenne muscular dystrophy with retention of dystrophin protein. *Hum Mutat* 2003; **21**(6):651.

Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991; **49**(1):54-67.

Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990a; **86**:45-48.

Beggs AH, Kunkel LM. A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. *Nucleic Acids Res* 1990b; **18**(7):1931.

Beggs AH, Kunkel LM. Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1990c; **85**(3):613-9.

Bennett RR, den Dunnen J, O'Brien KF, Darras BT, Kunkel LM. Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing. *BMC Genet* 2001;**2**:17.

Bérout C, Carrié A, Beldjord C, Deburgrave N, Llense S, Carelle N, et al. Dystrophinopathy caused by mid-intronic substitutions activating cryptic exons in the DMD gene. *Neuromuscul Disord* 2004; **14**(1):10-18.

Bertoni C, Lau C, Rando TA. Restoration of dystrophin expression in mdx muscle cells by chimeraplast-mediated exon skipping. *Hum Mol Genet* 2003; **12**(10):1087-99.

Bies RD, Caskey CT, Fenwick R. An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function. *J Clin Invest* 1992a; **90**(2):666-72.

Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 1992b; **20**:1725-1731.

Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J. Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**(4):133-5.

Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002; **82**(2):291-329.

Brenman JE, Chao DS, Xia H, Alpade K, Bredt DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995; **82**:743-752.

Bresolin N, Castelli E, Comi GP, Felisari G, Bardoni A, Perani D, et al. Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1994; **4**(4):359-69.

Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**(4):1189-92.

Bulman DE, Gangopadhyay SB, Bebhuck KG, Worton RG, Ray PN. Point mutation in the human dystrophin gene: identification through western blot analysis. *Genomics* 1991; **10**(2):457-460.

Buratti E, Baralle FE. Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol Cell Biol* 2004; **24**(24):10505-14.

Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**(21):4364-75.

Buvoli M, Buvoli A, Leinwand LA. Interplay between exonic splicing enhancers, mRNA processing, and mRNA surveillance in the dystrophic Mdx mouse. *PLoS ONE* 2007; **2**(5):e427.

Buzin CH, Feng J, Yan J, Scaringe W, Liu Q, den Dunnen J, Mendell JR, Sommer SS. Mutation rates in the dystrophin gene: a hotspot of mutation at a CpG dinucleotide. *Hum Mutat* 2005; **25**(2):177-88.

Byers TJ, Kunkel LM, Watkins SC. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol* 1991; **115**(2):411-21.

Cáceres JF, Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 2002; **18**(4):186-93.

Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989; **338**:259-262.

Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton- extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; **80**:675-9.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; **3**(4):285-98.

Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Research* 2003; **31**(13): 3568-3571.

Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**(23):11141-56.

Chamberlain JS. Muscular dystrophy meets the gene chip: new insights into disease pathogenesis. *J Cell Biol* 2000; **151**(6):F43-5.

Chaturvedi LS, Mukherjee M, Srivastava S, Mittal RD, Mittal B. Point mutation and polymorphism in Duchenne/Becker muscular dystrophy (D/BMD) patients. *Exp Mol Med* 2001; **33**(4):251-6.

Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, Hamard G, Chafey P, Récan D, *et al.* Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 1990; **63**(6):1239-48.

Chen S, Anderson K, Moore MJ. Evidence for a linear search in bimolecular 3' splice site AG selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**(2):593-8.

Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, de Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1991; **49**(5):951-60.

Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000; **23**(10):1456-71.

Constantin B, Sebillé S, Cognard C. New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. *J Muscle Res Cell Motil* 2006; **27**(5-7):375-86.

Crawford GE, Faulkner JA, Crosbie RH, Campbell KP, Froehner SC, Chamberlain JS. Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J Cell Biol* 2000; **150**(6):1399-410.

Dalkilic I, Kunkel LM. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2003; **13**(3):231-8.

Davies KE. Challenges in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1997; **7**:482-486.

Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC, Récan D, Peccate C, Burghes AH, et al. Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Hum Mutat* 2007; **28**(2):183-95.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001; **109**:121–12.

Dent KM, Dunn DM, von Niederhausern AC, Aoyagi AT, Kerr L, Bromberg MB, et al. Improved molecular diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort. *Am J Med Genet A* 2005; **134**(3):295-8.

Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; **380**(6570):152-4.

Disatnik MH, Chamberlain JS, Rando TA. Dystrophin mutations predict cellular susceptibility to oxidative stress. *Muscle Nerve* 2000; **23**(5):784-92.

Disset A, Bourgeois CF, Benmalek N, Claustres M, Stevenin J, Tuffery-Giraud S. An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements. *Hum Mol Genet* 2006; **15**(6):999-1013.

Dolinsky LC, de Moura-Neto RS, Falcão-Conceição DN. DGGE analysis as a tool to identify point mutations, de novo mutations and carriers of the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord* 2002; **12**(9):845-8.

Dubowitz V, Sewry V. A. Muscle Biopsy: A Practical Approach. Warks, UK: Elsevier Health Sciences 2006.

Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmüller H. Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve* 2003; **27**(5):624-7.

Dunckley MG, Manoharan M, Villiet P, Eperon IC, Dickson G. Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum Mol Genet* 1998; **7**(7):1083-90.

Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**(3):349-61.

Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002; **359**:987-695.

Emery AEH. Duchenne Muscular Dystrophy. 2nd edition. New York: Oxford University Press, 1993.

England SB, Nicholson LV, Johnson MA, et al.. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 1990; **343**:180-182.

Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991; **66**:1121-1131.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990; **345**:315-319.

Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1772**(2):108-17.

Fajkusová L, Lukás Z, Tvrdíková M, Kuhrová V, Hájek J, Fajkus J. Novel dystrophin mutations revealed by analysis of dystrophin mRNA: alternative splicing suppresses the phenotypic effect of a nonsense mutation. *Neuromuscul Disord* 2001; **11**(2):133-8.

Fanin M, Freda MP, Vitiello L, Danieli GA, Pegoraro E, Angelini C. Duchenne phenotype with in-frame deletion removing major portion of dystrophin rod: threshold effect for deletion size? *Muscle Nerve* 1996; **19**(9):1154-60.

Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003; **17**(4):419-37.

Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM. Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: application to the 5' region of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 1991; **48**(3):621-7.

Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 1989; **338**(6215):509-11.

Ferlini A, Sewry C, Melis MA, Mateddu A, Muntoni F. X-linked dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord* 1999; **9**(5):339-46.

Flanigan KM, von Niederhausern A, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 2003; **72**(4):931-9.

Freund AA, Scola RH, Arndt RC, Lorenzoni PJ, Kay CK, Werneck LC. Duchenne and Becker muscular dystrophy: a molecular and immunohistochemical approach. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; **65**(1):73-6.

Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 1999; **8**(10):1893-1900.

Gailly P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1600**(1-2):38-44.

Gardner RJ, Bobrow M, Roberts RG. The identification of point mutations in Duchenne muscular dystrophy patients by using reverse-transcription PCR and the protein truncation test. *Am J Hum Genet* 1995; **57**(2):311-20.

Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Smith B, Burghes AH, Thompson MW et al. Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich

region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am J Hum Genet* 1989; **45**(4):507-20.

Ginjaar IB, Kneppers AL, Meulen JD, Anderson LV, Bremmer-Bout M, van Deutekom JC, Weegenaar J, et al. Dystrophin nonsense mutation induces different levels of exon 29 skipping and leads to variable phenotypes within one BMD family. *Eur J Hum Genet* 2000; **8**(10):793-6.

Goldberg LR, Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Duggan DJ, Steinberg LS, Hoffman EP. A dystrophin missense mutation showing persistence of dystrophin and dystrophin-associated proteins yet a severe phenotype. *Ann Neurol* 1998; **44**(6):971-6.

González E, Montañez C, Ray PN, Howard PL, García-Sierra F, Mornet D, Cisneros B. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett* 2000; **482**(3):209-14.

Górecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* 1992; **1**(7):505-10.

Goren A, Ram O, Amit M, Keren H, Lev-Maor G, Vig I, Pupko T, Ast G. Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences - the complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell* 2006; **22**(6):769-781.

Gospe SM Jr, Lazaro RP, Lava NS, Grootscholten PM, Scott MO, Fischbeck KH. Familial X-linked myalgia and cramps: a nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. *Neurology* 1989; **39**(10):1277-80.

Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Müller CR, Müller B. On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in

oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J Med Genet* 1994; **31**(3):183-6.

Grimm T, Müller B, Müller CR, Janka M. Theoretical considerations on germline mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1990; **27**(11):683-7.

Hamed SA, Hoffman EP. Automated sequence screening of the entire dystrophin cDNA in Duchenne dystrophy: point mutation detection. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; **141B**(1):44-50.

Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; **51**:919-928.

Hoffman EP, Dressman D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. *Trends Pharmacol Sci* 2001; **22**(9):465-70.

Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1988; **318**(21):1363-8.

Hofstra RM, Mulder IM, Vossen R, de Koning-Gans PA, Kraak M, Ginjaar IB, et al. DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2004; **23**(1):57-66.

Howard PL, Dally GY, Wong MH, Ho A, Weleber RG, Pillers DA, Ray PN. Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum Mol Genet* 1998; **7**(9):1385-91.

Huang X, Poy F, Zhang R, Joachimiak A, Sudol M, Eck MJ. Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol* 2000; **7**(8):634-8.

Hu XY, Burghes AH, Ray PN, Thompson MW, Murphy EG, Worton RG. Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J Med Genet* 1988; **25**(6):369-76.

Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet* 1990; **46**(4):682-95.

Isken O, Maquat LE. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 2007; **21**(15):1833-56.

Judge LM, Haraguchin M, Chamberlain JS. Dissecting the signaling and mechanical functions of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci* 2006; **119**(8):1537-46.

Kalnina Z, Zayakin P, Silina K, Linē A. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; **42**(4):342-57.

Kerr TP, Sewry CA, Robb SA, Roberts RG. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet* 2001; **109**(4):402-7.

Kesari A, Pirra LN, Bremadesam L, McIntyre O, Gordon E, Dubrovsky AL, Viswanathan V, Hoffman EP. Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule. *Hum Mutat* 2008; **29**(5):728-37.

Kilimann MW, Pizzuti A, Grompe M, Caskey CT. Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR. *Hum Genet* 1992; **89**(3):253-8.

King SC, Roche AL, Passos-Bueno MR, Takata R, Zatz M, Cockburn DJ, et al. Molecular characterization of further dystrophin gene microsatellites. *Mol Cell Probes* 1995; **9**(5):361-70.

King SC, Stapleton PM, Walker AP, Love DR. Two dinucleotide repeat polymorphisms at the DMD locus. *Hum Mol Genet* 1994; **3**(3):523.

Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989; **45**(4):498-506.

Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; **50**:509-517.

Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 1990; **265**(8):4560-6.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel L. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; **53**:219-226.

Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 1992; **90**:41-54.

Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, Cooper DN. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat* 2007; **28**(2):150-8.

Kunkel LM, Hejtmancik JF, Caskey CT, Speer A, Monaco AP, Middlesworth W, et al.. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1986; **322**(6074):73-7.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 2004; **94**(8):1023-31.

Lenk U, Hanke R, Thiele H, Speer A. Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet* 1993; **2**(11):1877-81.

Lenk U, Oexle K, Voit T, Ancker U, Hellner KA, Speer A, Hübner C. A cysteine 3340 substitution in the dystroglycan-binding domain of dystrophin associated with Duchenne muscular dystrophy, mental retardation and absence of the ERG b-wave. *Hum Mol Genet* 1996; **5**(7):973-5.

Lo IF, Lai KK, Tong TM, Lam ST. A different spectrum of DMD gene mutations in local Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Chin Med J (Engl)* 2006; **119**(13):1079-87.

Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, Xue SA, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003; **9**(8):1009-14.

Lu QL, Morris GE, Wilton SD, Ly T, Artem'yeva OV, Strong P, Partridge TA. Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J Cell Biol* 2000; **148**(5):985-96.

Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Burghes AH, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, et al.. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 1988; **242**(4879):755-9.

Maquat LE. NASTy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on. *Genes Dev* 2002; **16**(14):1743-53.

Matsumoto T, Niikawa N. Eight novel microsatellite markers in the 3' region of the dystrophin gene useful for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Prenat Diagn* 2004; **24**(12):1014-5.

Matsumura K, Burghes AH, Mora M, Tomé FM, Morandi L, Cornello F, et al. Immunohistochemical analysis of dystrophin-associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in-frame deletions in the NH2-terminal and rod domains of dystrophin. *J Clin Invest* 1994; **93**(1):99-105.

McCabe ER, Towbin J, Chamberlain J, Baumbach L, Witkowski J, van Ommen GJ, Koenig M, Kunkel LM, Seltzer WK. Complementary DNA probes for the Duchenne muscular dystrophy locus demonstrate a previously undetectable deletion in a patient with dystrophic myopathy, glycerol kinase deficiency, and congenital adrenal hypoplasia. *J Clin Invest* 1989; **83**(1):95-9.

Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; **32**(1):277-307.

Miller MP, Kumar S. Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation. *Hum Mol Genet* 2001; **10**(21):2319-28.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1998; **16**:1215.

Miriami E, Sperling R, Sperling J, Motro U. Regulation of splicing: the importance of being translatable. *RNA* 2004; **10**(1):1-4.

Moizard MP, Toutain A, Fournier D, Berret F, Raynaud M, Billard C, et al. Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Genet* 2000; **8**(7):552-556.

Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; **2**(1):90-95.

Morandi L, Mora M, Confalonieri V, Barresi R, Di Blasi C, Brugnoli R, et al. Dystrophin characterization in BMD patients: correlation of abnormal protein with clinical phenotype. *J Neurol Sci* 1995; **132**(2):146-155.

Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A, et al.. Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1993; **329**(13):921-925.

Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003; **2**(12):731-740.

Nachman MW. Haldane and the first estimates of the human mutation rate. *J Genet* 2004; **83**(3):231-233.

Nicholson LV, Bushby KM, Johnson MA, den Dunnen JT, Ginjaar IB, van Ommen GJ. Predicted and observed sizes of dystrophin in some patients with gene deletions that disrupt the open reading frame. *J Med Genet* 1992; **29**(12):892-6.

Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar IB, et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical,

genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 3. Differential diagnosis and prognosis. *J Med Genet* 1993; **30**(9):745-51.

Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar IB, et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 2. Correlations within individual patients. *J Med Genet* 1993; **30**(9):737-744.

Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar IB, et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 1. Trends across the clinical groups. *J Med Genet* 1993; **30**(9):728-736.

Nicholson LV. The rescue of dystrophin synthesis in boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1993; **3**(5-6):525-531.

Nigro V, Nigro G, Esposito MG, Comi LI, Molinari AM, Puca GA, Politano L. Novel small mutations along the DMD/BMD gene associated with different phenotypes. *Hum Mol Genet* 1994; **3**(10):1907-1908.

Nowak KJ, Davies KE. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* 2004; **5**(9):872-876.

Oudet C, Heilig R, Mandel JL. An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of dystrophin gene. *Hum Genet* 1990; **85**(6):677.

Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 2004; **5**(5):389-96.

Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers AL, Takata RI, Rapaport D, den Dunnen JT, et al. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy

(DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am J Hum Genet* 1992; **51**(5):1150-5.

Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol* 2004; **12**(3-4):311-9.

Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**:3710-3714.

Pillers DA, Bulman DE, Weleber RG, Sigesmund DA, Musarella MA, Powell BR, et al.. Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet* 1993; **4**(1):82-6.

Pillers DA, Weleber RG, Green DG, Rash SM, Dally GY, Howard PL, et al. Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: genotype-phenotype analysis of duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Mol Genet Metab* 1999; **66**(2):100-10.

Ponting CP, Blake DJ, Davies KE, Kendrick-Jones J, Winder SJ. ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**:1-13.

Powell JF, Fodor FH, Cockburn DJ, Monaco AP, Craig IW. A dinucleotide repeat polymorphism at the DMD locus. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**(5):1159.

Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, et al. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet* 1995; **57**(1):22-33.

Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn* 2005; **7**(3):317-26.

Rafael JA, Cox GA, Corrado K, Jung D, Campbell KP, Chamberlain JS. Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure-function correlations. *J Cell Biol* 1996; **134**(1):93-102.

Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**(10):5363-8.

Rando TA. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a "two hit" hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Tech* 2001a; **55**(4):223-35.

Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001b; **24**(12):1575-94.

Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**(6):2331-5.

Roberts RG, Bobrow M. Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum Mol Genet* 1998; **7**(4):589-95.

Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993; **16**(2):536-8.

Roberts RG, Gardner RJ, Bobrow M. Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum Mutat* 1994; **4**(1):1-11.

Roberts RG, Montandon AJ, Bobrow M, Bentley DR. Detection of novel genetic markers by mismatch analysis. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**(15):5961-71.

Roberts RG. Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol* 2001; **2**(4):REVIEWS3006.

Roca X, Sachidanandam R, Krainer AR. Determinants of the inherent strength of human 5' splice sites. *RNA* 2005; **11**(5):683-98

Roest PA, Roberts RG, van der Tuijn AC, Heikoop JC, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. *Neuromuscul Disord* 1993; **3**:391–394.

Rosa G, Ceccarini M, Cavaldesi M, Zini M, Petrucci TC. Localization of the dystrophin binding site at the carboxyl terminus of beta-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **223**(2):272-7.

Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* 1996; **135**:661-672.

Rybakova IN, Ervasti JM. Dystrophin-glycoprotein complex is monomeric and stabilizes actin filaments in vitro through a lateral association. *J Biol Chem* 1997; **272**:28771-28778.

Rybakova IN, Patel JR, Davies KE, Yurchenco PD, Ervasti JM. Utrophin binds laterally along actin filaments and can couple costameric actin with sarcolemma when overexpressed in dystrophin-deficient muscle. *Mol Biol Cell* 2002; **13**(5):1512-21.

Saad FA, Vita G, Mora M, Morandi L, Vitiello L, Oliviero S, Danieli GA. A novel nonsense mutation in the human dystrophin gene. *Hum Mutat* 1993; **2**(4):314-6.

Schmitz F, Drenckhahn D. Dystrophin in the retina. *Prog Neurobiol* 1997; **53**(5):547-60.

Shiga N, Takeshima Y, Sakamoto H, Inoue K, Yokota Y, Yokoyama M, Matsuo M. Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1997; **100**(9):2204-10.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989; **244**(4912):1578-80.

Sigesmund DA, Weleber RG, Pillers DA, Westall CA, Panton CM, Powell BR, et al. Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology* 1994; **101**(5):856-6.

Sironi M, Cagliani R, Comi GP, Pozzoli U, Bardoni A, Giorda R, Bresolin N. Trans-acting factors may cause dystrophin splicing misregulation in BMD skeletal muscles. *FEBS Lett* 2003; **537**(1-3):30-4.

Sironi M, Cagliani R, Pozzoli U, Bardoni A, Comi GP, Giorda R, Bresolin N. The dystrophin gene is alternatively spliced throughout its coding sequence. *FEBS Lett* 2002; **517**(1-3):163-6.

Sitnik R, Campiotto S, Vainzof M, Pavanello RC, Takata RI, Zatz M, Passos-Bueno MR. Novel point mutations in the dystrophin gene. *Hum Mutat* 1997; **10**(3).

Smith TA, Yau SC, Bobrow M, Abbs SJ. Identification and quantification of somatic mosaicism for a point mutation in a Duchenne muscular dystrophy family. *J Med Genet* 1999; **36**(4):313-5.

Suminaga R, Takeshima Y, Wada H, Yagi M, Matsuo M. C-terminal truncated dystrophin identified in skeletal muscle of an asymptomatic boy with a novel nonsense mutation of the dystrophin gene. *Pediatr Res* 2004; **56**(5):739-43.

Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, Ikezawa M, Nonaka I, Matsuo M. Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Hum Mol Genet* 1999; **8**(3):493-500.

Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, Pramono ZA, Matsuo M. Six novel transcripts that remove a huge intron ranging from 250 to 800 kb are produced by alternative splicing of the 5' region of the dystrophin gene in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **239**(3):895-9.

Tkatchenko AV, Piétu G, Cros N, Gannoun-Zaki L, Auffray C, Léger JJ, Dechesne CA. Identification of altered gene expression in skeletal muscles from Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord* 2001; **11**(3):269-77.

Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993; **87**(6):1854-65.

Tuffery S, Lenk U, Roberts RG, Coubes C, Demaille J, Claustres M. Protein truncation test: analysis of two novel point mutations at the carboxy-terminus of the human dystrophin gene associated with mental retardation. *Hum Mutat* 1995; **6**(2):126-35.

Tuffery-Giraud S, Chambert S, Demaille J, Claustres M. Point mutations in the dystrophin gene: evidence for frequent use of cryptic splice sites as a result of splicing defects. *Hum Mutat* 1999; **14**(5):359-68.

Tuffery-Giraud S, Saquet C, Chambert S, Echenne B, Marie Cuisset J, Rivier F, Cossée M, et al. The role of muscle biopsy in analysis of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy: experience of a national referral centre. *Neuromuscul Disord* 2004; **14**(10):650-8.

Tuffery-Giraud S, Saquet C, Thorel D, Dissot A, Rivier F, Malcolm S, Claustres M. Mutation spectrum leading to an attenuated phenotype in dystrophinopathies. *Eur J Hum Genet* 2005; **13**(12):1254-60.

Vainzof M, Takata RI, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Zatz M. Is the maintainance of the C-terminus domain of dystrophin enough to ensure a milder Becker muscular dystrophy phenotype? *Hum Mol Genet* 1993; **2**(1):39-42.

van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007; **357**(26):2677-86.

van Deutekom JC, van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; **4**(10):774-83.

van Essen AJ, Abbs S, Baiget M, Bakker E, Boileau C, van Broeckhoven C, Bushby K, et al. Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum Genet* 1992; **88**(3):249-57.

van Essen AJ, Mulder IM, van der Vlies P, van der Hout AH, Buys CH, Hofstra RM, den Dunnen JT. Detection of point mutation in dystrophin gene reveals somatic and germline mosaicism in the mother of a patient with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet A* 2003; **118A**(3):296-8.

Walton JN, Nattrass FJ. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain* 1954; **77**:169-231.

Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 2007; **8**(10):749-61.

White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, Vollebregt E, et al. Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; **71**(2):365-74.

White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers AL, Lalic T, et al. Duplications in the DMD gene. *Hum Mutat* 2006; **27**(9):938-45.

Wilton SD, Lloyd F, Carville K, Fletcher S, Honeyman K, Agrawal S, Kole R. Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord* 1999; **9**(5):330-8.

Winnard AV, Mendell JR, Prior TW, Florence J, Burghes AH. Frameshift deletions of exons 3-7 and revertant fibers in Duchenne muscular dystrophy: mechanisms of dystrophin production. *Am J Hum Genet* 1995; **56**(1):158-66.

Worton RG, Brooke MH. The X-linked muscular dystrophies. (Chapter 140). Scriver CR, Beaudet al., Sly WS, Valle D, editors. New York: McGraw-Hill 1995.

Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem* 1995; **270**:11711-11714.

Yoshida M, Ozawa E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem* 1990; **108**:748-752.

Zhang C, Li W-H, Krainer AR, Zhang MQ. RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**(15): 5797-802.

Zhang XH, Leslie CS, Chasin LA. Dichotomous splicing signals in exon flanks. *Genome Res* 2005; **15**(6):768-79.

Zhang Z, Habara Y, Nishiyama A, Oyazato Y, Yagi M, Takeshima Y, Matsuo M. Identification of seven novel cryptic exons embedded in the dystrophin gene and characterization of 14 cryptic dystrophin exons. *J Hum Genet* 2007; **52**:607-617.

7. ANEXOS

7.1 - Procedimentos complementares

7.1.1 - Procedimento de extracção de DNA

- a) Adicionou-se TLE ao sangue periférico até ser atingido um volume final de 50 ml. Homogeneizou-se colocou-se em gelo durante 20 min (no mínimo). Centrifugou-se a 720 g durante 10 min a 8 °C.
- b) Rejeitou-se o sobrenadante obtido, ressuspendeu-se o *pellet* de leucócitos, adicionou-se 10 ml de TLE. Centrifugou-se a 720 g durante 10 min a 8 °C.
- c) Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 3 ml de TLN.
- d) Adicionou-se 100 µl de *Proteinase K* 10 mg/ml e 300 µl SDS 10% (m/v).
- e) Incubou-se a 37 °C *overnight*.
- f) Adicionou-se 1 ml de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e agitou-se vigorosamente durante 15 seg. Centrifugou-se a 1620 g durante 15 min.
- g) Transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante obtido um novo tubo.
- h) Precipitou-se o DNA por adição de 2 volumes de etanol absoluto (o dobro da quantidade de sobrenadante obtido em 13.).
- i) Enrolou-se o DNA precipitado na ponta de uma pipeta de Pasteur anteriormente boleada à chama.
- j) Lavou-se o DNA enrolado 3-4x com etanol 70% (v/v).
- k) Dissolveu-se o DNA em *DNA Hydration Solution*. (*Puregene™ DNA Hydration Solution-Blood Kit* da Gentra).
- l) Para uma dissolução completa, incubou-se o DNA a 65 °C durante 30 min, seguida de incubação *overnight* à temperatura ambiente num agitador rotativo.

7.1.2 - Procedimento de extracção de RNA (método Versagene)

- a) Adicionou-se 4 µl de *TCEP Solution* a 400 µl de *Lysis Solution*.
- b) Colocou-se o músculo num homogeneizador de vidro (previamente tratado com DEPC e autoclavado) e adicionou-se a solução preparada no

passo 1, mantendo o homogeneizador no gelo.

c) Procedeu-se à homogeneização com a ajuda da vareta, até à lise total da amostra.

d) Transferiu-se o lisado para um *eppendorf* de 2 ml e adicionou-se 20 µl de *Proteinase K* 10 mg/ml ao lisado e agitou-se no vórtex durante 10 seg.

e) Incubou-se 10 min em gelo.

f) Transferiu-se os 400 µl de lisado para uma *Preclear™ Column* colocada num tubo verde. Centrifugou-se a 400 g durante 1 min.

g) Rejeitou-se a *Preclear™ Column* transferiu-se o lisado para uma *Purification Column* colocada num tubo transparente. Centrifugou-se a 16000 g durante 1 min.

h) Transferiu-se a *Purification Column* para um tubo novo transparente (*Collection Tube*).

i) Adicionou-se 400 µl de *Wash 1 Solution* à *Purification Column*. Centrifugou-se a 16000 g durante 1 min.

j) Transferiu-se a *Purification Column* para um tubo novo transparente (*Collection Tube*) e adicionou-se 200 µl de *Wash 2 Solution* à *Purification Column*. Centrifugou-se a 16000 g durante 1 min.

k) Adicionou-se mais 200 µl de *Wash 2 Solution* à *Purification Column* e centrifugou-se a 16000 g durante 2 min.

l) Transferiu-se a *Purification Column* para um tubo novo transparente (*Collection Tube*) e adicionou-se 50-100 µl de *Elution Solution* à *Purification Column* para eluir o RNA. Centrifugou-se a 16000 g durante 1 min.

m) Rejeitar a *Purification Column*.

7.2 - Sequência de primers e preparação das misturas de marcadores

Tabela 7.2.1 – Descrição dos primers utilizados na análise por haplotipagem

<i>Marcador</i>	<i>Sequência (5'→ 3')</i>
DMDSTR 44	F – TCCAACATTGGAAATCACATTTCAA R – TCATCACAAATAGATGTTTCACAG
DMDSTR 45	F – GAGGCTATAATTCTTTAACTTTGGC R – CTCTTCCCTCTTTATTCATGTTAC
DMDSTR 49	F – CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC R – CATATGATACGATTCGTGTTTTGC
DMDSTR 50	F – AAGGTTCCCTCCAGTAACAGATTTGG R – TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC
MP1P	F – ATGATCAGAGTGAGTAATCGGTTGG R – ATATCGATCTAGCAGCAGGAAGCTGAAGCTGAATG
3'DysMSC	F – GAAAGATTGTAAACTAAAGTGTGC R – GGATGCAAAACAATGCGCTGCCTC
5'DysII	F – TCTTGATATATAGGGATTATTTGTGTTTGTATAC R – ATTATGAAACTATAAGGAATAAATCATTTAGC
5'DysIII	F – TTTTGTAGGTATAACTTACATACAATAAACC R – GTGACAATAAGCATATCAGTGGCTGCC
DMDSTR07A	F – TTCTGGTTTTCTGGTCTG R – GAATCAATCTCTCTGTCAAG
DMDSTR07B	F – AGCTATTATCTGAGAAAGTC R – TGAGGTGAATTTATTAAGGG
p20	F – ACAGAAGGGGAGGTACAGCA R – GCCACAACATATGCTTGAAAGA
3'DMD1-2c	F – TGTCTGTCTTCAGTTATATG R – TGTCTGTCTTCAGTTATATG
5'- 5n3	F – TTCAGTTTCTCTCGGTGTTTCCT R – TACACCTGCACATGTGATGAAA
5'- 7n4	F – GTGAAGCTACAAAAATATTAGAG R – CAACAATATCTCACCATACTTG
3'-19n8	F – AGCCCCATTCTGTACATCAAAT R – AACGACTTCCCCCACTCTGT

F: primer forward; R: primer reverse.

Tabela 7.2.2 - Quantidade (µl) dos marcadores em cada um dos painéis (a partir de diluições a 10pmol/ µl)

<i>Painel 1</i>		<i>µl</i>	<i>Painel 2</i>		<i>µl</i>	<i>Painel 3</i>		<i>µl</i>	<i>Painel 4</i>		<i>µl</i>
DMDSTR 44	F- 30 R- 30		MP1P	F- 15 R- 15		DMDSTR07A	F- 20 R- 20		5'- 5n3	F- 15 R- 15	
DMDSTR 45	F- 10 R- 10		3'DysMSC	F- 20 R- 20		DMDSTR07B	F- 20 R- 20		5'- 7n4	F- 15 R- 15	
DMDSTR 49	F- 10 R- 10		5'DysII	F- 20 R- 20		p20	F- 20 R- 20		3'-19n8	F- 20 R- 20	
DMDSTR 50	F- 10 R- 10		5'DysIII	F- 30 R- 30		3'DMD1-2c	F- 20 R- 20				
H₂O		60		---			---		H₂O		60

Tabela 7.2.3 – Descrição dos primers utilizados no RT-PCR

<i>Primers</i>	<i>Região</i>	<i>Sequência (5'-> 3')</i>
DMD-F1	Exão 1	F – TTCCCCCTACAGGACTCAG
	Exão 10	R – CTCTCCATCAATGAACTGCC
DMD-F2	Exão 9	F – CGATTCAAGAGCTATGCCTAC
	Exão 18	R – GCGAGTAATCCAGCTGTGAAG
DMD-F3	Exão 17	F – CATGCTCAAGAGGAACTTCC
	Exão 25	R – CTGAGTGTTAAGTTCTTTGAG
DMD-F4	Exão 25	F – CAATTCAGCCCAGTCTAAAC
	Exão 33	R – CAAAGCTGTTACTCTTTCATC
DMD-F5	Exão 33	F – GTCTGAGTGAAGTGAAGTCTG
	Exão 40	R – CCTTTCATCTCTGGGCTCAG
DMD-F6	Exão 40	F – CTCTAGAAATTTCTCATCAG
	Exão 44	R – GCATGTTCCCAATTCTCAGG
DMD-F7	Exão 43	F – GCACAGCCTGTGGAAAGGGTG
	Exão 51	R – GTCACCACACATCACCCTCTG
DMD-F8	Exão 51	F – CTAGAAATGCCATCTTCCTTG
	Exão 58	R – CTCAGGAGGCAGCTCTCTGG
DMD-F9	Exão 57	F – GGGCCTTCAAGAGGGAATTG
	Exão 68	R – CCAGTCTCATCCAGTCTAGG
DMD-F10	Exão 67	F – GGTGAAGTTGCATCCTTTGG
	3'ÚTR	R – CATGACTGATACTAAGGACTC

Tabela 7.1.3 – Descrição dos primers utilizados no PCR Nested

<i>Primers</i>	<i>Exões</i>	<i>Sequência (5'-> 3')</i>
DMD-F1N	Exão 1	F – CTGGGAGGCAATTACCTTCGG
	Exão 10	R – GACTTGTCTTCAGGAGCTTG
DMD-F2N	Exão 9	F – CCTCTGACCCTACACGGAGC
	Exão 18	R – CAGTTATATCAACATCCAACC
DMD-F3N	Exão 17	F – GCAGATTACTGTGGATTCTG
	Exão 25	R – GTCTCAAGTCTCGAAGCAAAC
DMD-F4N	Exão 25	F – GTGTCAATGAAGGTGGGCAG
	Exão 33	R – CTGCTTTTTCTGTACAATCTG
DMD-F5N	Exão 33	F – GAAATGGTGATAAAGACTGG
	Exão 40	R – CAATGTCATCCAAGCATTTT
DMD-F6N	Exão 40	F – GGTATCAGTACAAGAGGCAG
	Exão 44	R – CTGTTCAAGCTTCTGTTAGCC
DMD-F7N	Exão 43	F – CAGGAAGCTCTCTCCCAGC
	Exão 51	R – GGTAAGTTCTGTCCAAGCCCGG
DMD-F8N	Exão 51	F – CTGCTCTGGCAGATTTCAAC
	Exão 58	R – CTCCTGGTAGAGTTTCTCTAG
DMD-F9N	Exão 57	F – CTAAAGAACCTGTAATCATG
	Exão 68	R – GGGCCGCTTCGATCTCTGGC
DMD-F10N	Exão 67	F – GGCAGTAACATTGAGCCAAG
	3'ÚTR	R – CCAAATCATCTGCCATGTGG

7.3 - Soluções

A – Soluções de trabalho gerais

A1. TAE (50x): tris 2 M, acetato 1 M, EDTA 50 mM

Tris Base <i>grau u.p.</i> (M = 121,1 g/mol)	242,2 g
Ácido acético glacial 100% <i>p.a.</i> (M = 60,05 g/mol, 1 l = 1,05 kg)	57,2 ml
EDTA-NaOH 0,5 M pH 8,0 (solução A2)	100,0 ml
ddH ₂ O estéril	q.b. 1000 ml

A2. EDTA-NaOH 0,5 M pH 8,0

EDTA <i>grau b.m.</i> (M = 372,2 g/mol)	186,1 g
ddH ₂ O estéril	q.b. 800 ml
• Ajustar pH = 8,0 com NaOH 10 M	

B3. Loading buffer:

azul bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%, Ficoll 400 15% (m/v)

Azul bromofenol 10% (m/v)	250,0 µl
Xilenocianol 10% (m/v)	250,0 µl
Ficoll 400 <i>grau b.m.</i>	1,5 g
ddH ₂ O estéril	q.b. 10 ml

B. Soluções utilizadas na extração de DNA

B1. TLE: NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 1 mM

NH ₄ Cl 1 M (solução B3)	155,0 ml
KHCO ₃ 1 M (solução B4)	10,0 ml
EDTA-NaOH 0,5 M pH 7,4 (solução B5)	2,0 ml
ddH ₂ O estéril	q.b. 1000 ml

B2. TLN: tris 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM

Tris-HCl 1 M pH 8,0 (solução B6)	10,0 ml
NaCl 5 M (solução B7)	80,0 ml
EDTA-NaOH 0,5 M pH 8,0 (solução A2)	4,0 ml
ddH ₂ O estéril	q.b. 1000 ml

B3. NH₄Cl 1 M

NH ₄ Cl (M = 53,49 g/mol)	53,5 g
--------------------------------------	--------

ddH ₂ O estéril	q.b. 1000 ml
----------------------------	--------------

B4. KHCO₃ 1 M

KHCO ₃ (M = 100,12 g/mol)	100,0 g
ddH ₂ O estéril	q.b. 1000 ml

B5. EDTA-NaOH 0,5 M pH 7,4

EDTA <i>grau b.m.</i> (M = 372,2 g/mol)	186,1 g
ddH ₂ O estéril	q.b. 800 ml
• Acertar pH = 7,4 com NaOH 10 M	

B6. Tris-HCl 1 M pH 8,0

Tris <i>grau u.p.</i> (M = 121,1 g/mol)	121,1 g
ddH ₂ O estéril	q.b. 800 ml

B7. NaCl 5 M

NaCl <i>grau b.m.</i> (M = 58,4 g/mol)	292,0 g
ddH ₂ O estéril	q.b. 1000 m

B8. Solução saturada de NaCl

NaCl <i>grau b.m.</i> (M = 58,4 g/mol)	± 43,5 g
ddH ₂ O estéril	q.b. 100 ml

B9. SDS 10% (m/v)

SDS (M = 288,38 g/mol)	100,0 g
ddH ₂ O estéril	q.b. 1000 ml

A18. Etanol 70% (v/v)

Etanol 100% <i>p.a.</i> (M = 46,07 g/mol, 1 l = 0,790 kg)	700,0 ml
ddH ₂ O estéril	q.b. 1000 ml